

EDUARDO MURILO NOVAK

**ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DA CICATRIZAÇÃO E REGENERAÇÃO EM
NERVOS ISQUIÁTICOS DE RATOS SUBMETIDOS A DESLIZAMENTO
EPINEURAL DO COTO DISTAL E SUTURA MICROCIRÚRGICA
TÉRMINO-TERMINAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau acadêmico de Doutor.

Orientador: Prof. Renato Tambara Filho

Co-orientador: Prof. Paulo Sérgio dos Santos

Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

**CURITIBA
2007**

EDUARDO MURILO NOVAK

**ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO DA CICATRIZAÇÃO E REGENERAÇÃO EM
NERVOS ISQUIÁTICOS DE RATOS SUBMETIDOS A DESLIZAMENTO
EPINEURAL DO COTO DISTAL E SUTURA MICROCIRÚRGICA
TÉRMINO-TERMINAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau acadêmico de Doutor.

Orientador: Prof. Renato Tambara Filho

Co-orientador: Prof. Paulo Sérgio dos Santos

Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

**CURITIBA
2007**

Ào pai, Régério Novak, por todos os ensinamentos e por ter não ter desperdiçado um segundo sequer quando ao nosso lado.

À mãe, Jane Novak, pelo exemplo de máximo amor incondicional dispensado aos filhos. Queria que você também estivesse aqui.

AGRADECIMENTOS

Às minhas irmãs, Vívian e Dayanne, pelo apoio em todas as minhas ações e pela consideração a minha pessoa, agradeço por vocês existirem.

Ao Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias e ao Programa de Pós-graduação – Clínica Cirúrgica do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade a mim confiada.

À CAPES, pelo apoio e estímulo no desenvolvimento da pesquisa.

Ao IPEM – Faculdade Evangélica do Paraná, pelo apoio aos alunos da Universidade Federal do Paraná.

Ao meu orientador, Prof. Renato Tambara Filho, notoriamente conhecido pela dedicação ao próximo e amor à profissão.

Ao meu co-orientador, Prof. Paulo Sérgio dos Santos, pela sua competência, caráter, dignidade e amizade.

Ao Prof. Luiz Carlos Sobania, paradigma de altruísmo, pela sua dedicação na área da saúde, no interesse em ajudar – a todos, independentemente de posicionamentos ideológicos – e pelos ensinamentos a nós repassados em Ortopedia e em Cirurgia da Mão.

À Prof. Anna Raquel Silveira Gomes, meu amor, meu supedâneo intelectual e emotivo, exemplo de ser humano, por tudo o que me ensinou e continua ensinando, principalmente nas diversas etapas de execução deste estudo.

À Prof. Giana Giostri, mentora deste trabalho, por tudo. Enumerar, aqui, as razões dos agradecimentos talvez me forçasse a incorrer em injustiça por esquecer alguma de suas inúmeras e nobres virtudes. Mas (impossível não atestar) merece registro a verdadeira amizade, a competência, a dedicação, a inteligência, a vontade, a garra, enfim, agradeço por trabalharmos juntos.

Ao Dr. Carlos Eduardo Sáenz, exemplo de profissional, pela amizade, ensinamentos e estímulo ao conhecimento.

Ao Dr. Roberto L. Sobania e Dr. Claudio Bonamin, pela amizade e contribuição em minha formação.

Aos demais médicos do Hospital de Fraturas XV, a quem devo minha formação nas especialidades.

Aos médicos do Hospital Infantil Pequeno Príncipe e ao Prof. Luiz Antonio

Munhoz da Cunha, pela grande contribuição na minha formação como Ortopedista e Cirurgião da Mão.

Ao Dr. Alencar Kenji Nagai, Dr. Alexandre Antonio de Camargo, Dr. Marcio Miyamoto, Dr. Rogério Favassa e Dr. Uraí de Oliveira, a quem também posso chamar de verdadeiros amigos, exemplos de empenho e dedicação profissional.

Ao Dr. Renato C. S. Raad e Dr. Marcus Malinoski, pela sua amizade e coleguismo.

Ao Prof. Fernando Hintz Greca pelo apoio na execução do projeto, e ao Misael Gomes Barbosa e ao Álvaro Machado, funcionários do Laboratório de Cirurgia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Ao Prof. Marco Antonio Ferreira Randi, pela vontade de ensinar, e pela capacidade de atingir tais objetivos.

À Prof. Lúcia de Noronha pela presteza e apoio, à bióloga Ana Paula Camargo Martins, e aos demais funcionários do Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná e à Sra. Vera Regina Fontana Pionteke, pelo apoio e ajuda no processamento do material.

À Prof. Valéria Paula Sassoli Fazan, da Universidade de São Paulo, pela ajuda no aprendizado e entendimento do estudo do nervo periférico.

Ao Prof. Stefano Geuna, da Universidade de Turim, Itália, pela sua dedicação e presteza. Pesquisador de tamanho renome, agradeço pela dispinibilidade, acessibilidade e paciência em ensinar.

Aos meus colegas do Hospital Cajuru e do Hospital Nossa Senhora das Graças.

Aos meus colegas do escritório H. Giostri, Dra. Hildegard, Dr. Josemar, Karina e Lucimara, pela amizade, ensino e apoio que sempre me deram, em todos os momentos.

Aos meus eternos mestres, pela incrível capacidade de sempre conseguir ensinar coisas novas.

Às demais pessoas que tiveram participação na minha formação, nos meus alicerces e neste estudo, as sinceras escusas por não nominá-las, pois o volume deste trabalho seria elevado à décima potência.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	ix
LISTA DE GRÁFICOS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. ANATOMIA DO NERVO PERIFÉRICO	8
2.2. PRINCÍPIOS GERAIS DA REGENERAÇÃO E REPARO NEURAL	11
2.2.1. Reparo epineural	14
2.2.2. Reparo Fascicular em Grupo	14
2.2.3. Reparo Fascicular	14
2.2.4. Reparo Epineural <i>versus</i> Reparo de Grupos de Fascículos	15
2.2.5. Enxerto Neural	16
2.2.6. Reparo Primário Direto <i>versus</i> Enxertia	17
2.2.7. Neurorrafia Término-lateral	17
2.3. CONDUTOS USADOS NA SUBSTITUIÇÃO DE NERVOS	18
2.3.1. Condutos de Origem Biológica	18
2.3.1.1. <i>Condutos de Veias</i>	18
2.3.1.2. <i>Condutos de Artéria</i>	19

2.3.1.3. <i>Condutos Baseados em Músculo Esquelético</i>	19
2.3.1.4. <i>Condutos Baseados na Bainha Epineural</i>	19
2.3.2. Condutos de Origem Sintética	20
2.3.2.1. <i>Condutos Inabsorvíveis</i>	20
2.3.2.2. <i>Condutos Absorvíveis</i>	21
3. MATERIAL E MÉTODO	23
3.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS	23
3.1.1. O Projeto Piloto	23
3.1.2. Divisão dos Grupos do Experimento	24
3.1.2.1. <i>Descrição da Técnica Cirúrgica – Exposição do Nervo Isquiático</i>	27
3.1.2.2. <i>Descrição da Técnica Cirúrgica – Sutura Convencional (SC)</i>	28
3.1.2.3. <i>Descrição da Técnica Cirúrgica – A Aplicação da Técnica em Estudo (DE)</i>	30
3.1.2.4. <i>O Período Pós-operatório</i>	30
3.1.2.5. <i>A Coleta de Material</i>	30
3.2. ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO	32
3.2.1. Obtenção dos Dados Histológicos	32
3.2.1.1. <i>Contagem das Fibras Mielínicas e Mensuração da Área do Axônio</i>	32
3.2.1.2. <i>Medida da espessura da bainha de mielina e do diâmetro da fibra</i>	36

axonal

3.2.1.3. <i>Análise dos resultados</i>	37
4. RESULTADOS	38
4.1. NUMERO DE FIBRAS MIELÍNICAS	38
4.2. ÁREA MÉDIA DAS FIBRAS AXONAIS	40
4.3. RAZÃO ENTRE O DIÂMETRO AXONAL E O DIÂMETRO DA FIBRA	41
5. DISCUSSÃO	42
6. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXO	60
Anexo – Aprovação pelo Comitê de Ética – PUC-PR	61

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 –	Fotografias demonstrando três tipos de guias para nervos (no topo) – A: a base de colágeno; B: a base de polilactide/caprolactona; C: a base de ácido poliglicólico (Schlosshauer et al., 2006); barra = 4 mm. Nas figuras embaixo (D, E e F) um exemplo da técnica para utilização de conduto à base de ácido poliglicólico (Weber et al., 2000)	21
FIGURA 2 –	Representação esquemática do local da incisão no nervo isquiático esquerdo do rato, com a passagem do ponto epineural	25
FIGURA 3 –	Representação esquemática da secção nervo isquiático esquerdo do rato	25
FIGURA 4 –	Esquema demonstrando o local de secção (linha escura) do epineuro do nervo isquiático do rato	26
FIGURA 5 –	Esquema ilustrando o deslizamento do epineuro em direção ao coto proximal, no qual a sutura foi realizada	27
FIGURA 6 –	Caixa de acondicionamento dos animais (A); método de tricotomia da pata traseira do rato (B); estação de trabalho e microscópio cirúrgico (C); posicionamento do animal (D)	28
FIGURA 7 –	Exposição do nervo isquiático por incisão longitudinal na região pósterolateral da coxa do rato	29
FIGURA 8 –	Fotografia da anastomose entre os cotos proximal e distal em rato submetido à sutura convencional epineural	29
FIGURA 9 –	Preenchimento somente da porção representativa da área axonal por meio de ferramentas de software	33
FIGURA 10 –	Exemplo de seleção das áreas das fibras axonais	34
FIGURA 11 –	Exemplo de cálculo da área da fibra axonal no programa ImageJ	35
FIGURA 12 –	Corte histológico transversal do nervo isquiático esquerdo de rato evidenciando fibras axonais mielínicas (objetiva de 100x), barra = μm . * representa a fibra axonal e a seta indica a bainha de mielina	35
FIGURA 13 –	Modo de obtenção da razão G (quociente d (diâmetro do axônio) / D (diâmetro da fibra do nervo))	36

- FIGURA 14 – Exemplo da medida da razão G. Em vermelho (d), o diâmetro da fibra axonal; em azul (D), o diâmetro total da fibra nervosa. Nesta imagem, a relação d/D foi de 0,69 37
- FIGURA 15 – Quadro comparativo histológico. Figura A: representa a fibra normal, proveniente do grupo Placebo; B: fibras mielínicas representativas do grupo SC; C: fibras do grupo DE. As fibras nervosas do grupo SC (B) e DE (C) apresentaram-se com maior concentração do que as do grupo Placebo (A). (objetiva de 100x, azul de toluidina) 39

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 –	Número de fibras nervosas mielínicas por campo \pm desvio-padrão dos ratos dos seguintes grupos experimentais: SC: grupo submetido a sutura convencional; DE: grupo no qual o deslizamento epineural foi realizado; grupo placebo: ratos submetidos a cirurgia sem procedimento microcirúrgico no nervo. * $p < 0,001$ quando comparado com o grupo placebo (ANOVA)	39
GRÁFICO 2 –	Área média da secção transversa das fibras axonais (μm^2) \pm desvio-padrão dos ratos dos seguintes grupos experimentais: SC: grupo submetido a sutura convencional; DE: grupo no qual o deslizamento epineural foi realizado; grupo controle: ratos submetidos a cirurgia sem procedimento microcirúrgico no nervo. * $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (ANOVA)	40
GRÁFICO 3 –	A média dos valores da razão entre o diâmetro axonal e o diâmetro da fibra nervosa (Razão G). * $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (ANOVA)	41

RESUMO

Enxertia autóloga de nervo é a técnica de eleição para o preenchimento de defeitos segmentares de nervos periféricos, apesar de suas desvantagens. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do deslizamento da bainha epineural do coto distal para cobrir um defeito criado no nervo isquiático esquerdo do rato. Vinte ratos Wistar machos foram divididos em três grupos: no grupo Placebo (Placebo, n=6), foi feita uma incisão na região glútea e o nervo ciático foi dissecado, mas deixado intacto; no grupo *sutura convencional* (SC, n=7) foi feita uma secção transversa, seguida de sutura epineural; no grupo *deslizamento epineural* (DE, n=7), após uma ressecção de 5 mm do nervo, foi realizada uma incisão circunferencial no epineuro distal, distante 5 mm da extremidade, e a bainha epineural foi deslizada e suturada na extremidade distal do epineuro do coto proximal. Após 12 semanas os nervos isquiáticos esquerdos foram processados para análise histomorfométrica. As seguintes variáveis foram avaliadas: número de fibras mielínicas, área axonal média e o diâmetro total da fibra com a bainha de mielina respectiva, para estabelecer a razão-G. Não houve diferenças significativas entre os grupos SC e DE para nenhum dos parâmetros avaliados ($p > 0,05$, ANOVA). Entretanto, um aumento no número de fibras mielínicas ($p < 0,001$, ANOVA) e uma diminuição na área média da fibra axonal ($p < 0,001$, ANOVA) e na razão-G foram observados, tanto no grupo SC quanto DE quando comparados ao grupo Placebo, embora não tenha havido diferenças estatísticas entre os grupos SC e DE. Pode-se inferir, por esses dados, que a técnica estudada é eficaz para a cobertura de defeitos segmentares de nervo de rato.

Palavras-chave: nervo periférico, regeneração, rato.

ABSTRACT

Autologous nerve grafting is the most widely used technique for bridging epineural gaps, despite its disadvantages. The aim of this study was to evaluate the effects of the distal sliding of the epineural sheath to cover a defect created in the left sciatic nerve of the rat. Twenty male Wistar rats were divided into three groups: in the *sham group* (sham, n=6), an incision was made and the sciatic nerve dissected, but left intact; in the *conventional suture* group (CS, n=7), a transverse section was made and an epineural suture carried out on the transected nerve; in the *sliding of the distal epineural sheath* group (SDES, n=7), after a 5 mm resection of the nerve, a circumferential cut in the distal epineurium was performed and the epineural sheath slid down and sutured into the distal end of the epineurium of the proximal stump. After 12 weeks the left sciatic nerves were processed for histomorphometric analyses and the following variables were evaluated: number of myelinated nerve fibers, mean cross-sectional axonal area and total fiber diameter with the respective myelin sheath, in order to establish the G-ratio. There were no statistical differences between CS and SDES for any of the variables analysed ($p>0.05$, ANOVA). However, an increase in the number of myelinated nerve fibres ($p<0.001$, ANOVA) and decreases in the mean axonal area ($p<0.001$, ANOVA) and in the G-ratio quotient were observed when either the SDES or SC groups were compared to the sham control, although with no statistical differences between the SDES and SC groups. It could be suggested that the sliding of the distal epineural sheath applied in this rat model provided a suitable conduit for regenerating the axons, eliminating the need to harvest a nerve from a donor site.

Keywords: peripheral nerve, regeneration, rat.

1. INTRODUÇÃO

Lesões de nervos periféricos ocorrem em aproximadamente 5% dos ferimentos nas extremidades e em 0,12% dos nascimentos (1). Porém, em que pesem o desenvolvimento de novas técnicas e materiais cirúrgicos, os resultados muitas vezes são desanimadores, principalmente quando ocorre uma secção total do nervo (neurotmese). Nessas situações, se o ferimento for inciso e tratado precocemente, é possível ser feita a anastomose primária entre os cotos. Se houve retração dos segmentos, entretanto, a tentativa de aproximação gerará tensão no local de sutura, promovendo resultados insatisfatórios, o que leva à necessidade de se usar um conduto que sirva como “ponte” para unir as extremidades.

Os primeiros dados acerca de reparo de lesão de nervos periféricos foram assinalados por Galeno, que fez a diferenciação entre nervo e tendão por volta do ano 300 d.C. Entretanto, os primeiros registros de reparação foram feitos por Ferrara em 1608¹, e a primeira indicação de reparo neural periférico coube a Mitchel et al.², em 1864, citados por Evans (2), os quais examinaram nervos lesados durante a Guerra Civil, demonstrando alterações tróficas nas áreas correspondentes às lesões. Por essa razão, recomendavam sutura dos cotos nervosos. Nos anos seguintes, naqueles casos em que houvesse perda de substância, ou retração tecidual em virtude do não-reparo primário, preconizava-se então a sutura mesmo sob tensão, o que levava a resultados desencorajadores (3).

Estudos de Millesi et al.(4) demonstraram que a enxertia de um segmento de nervo autólogo produzia melhores resultados do que a sutura sob tensão, embora ainda hoje não tenha sido resolvida a questão dos efeitos colaterais relacionados à sua retirada, como abordagem num sítio diverso do local a ser operado, limitação do comprimento, cicatriz e o próprio sacrifício de um nervo sensitivo. Por esses motivos, várias alternativas têm sido estudadas, a fim de se encontrar um conduto

¹ Ferrara G. Nuova selva di chirurgia divisa in tre parti venice. 1608: S Combi.

² Mitchell SW, Morehouse GR, Keen WW. In gunshot wounds and other injuries of nerves . Philadelphia: 1864, JB Lippincott..

viável, biológico ou não, ou mesmo uma técnica alternativa, como uma sutura látero-terminal, que dispense a necessidade do enxerto autólogo de nervo.

A partir da II Guerra Mundial houve um notável avanço nas microcirurgias de nervos periféricos, devido em grande parte aos estudos experimentais (5). Os últimos 20 anos, porém, têm sido os de maior desenvolvimento a respeito dos condutos nervosos, biológicos ou artificiais (6). O conceito que sustenta o uso de guias para os nervos é que as fibras nervosas em regeneração são capazes de se direcionar distalmente, com pouca reação tecidual e baixo índice de formação de neuroma (7) – embasamento advindo do estudo de Waller e Ranvier, segundo o qual os nervos se regeneram a partir do coto proximal, e não do coto distal (8). E esse crescimento é devido não somente ao fato de existir um tubo que guie os neurônios (fator mecânico), mas também por existirem fatores químicos (gradientes de fatores tróficos) que os conduzem a tal. Porém, uma vez que tenha havido a regeneração nervosa, a presença do tubo, por si, pode influenciar negativamente a evolução do quadro (9).

Provavelmente o primeiro relato de preenchimento de um defeito neural com um tubo foi feito por Glück, em 1880, que fez uso de um segmento de osso para completar a parte que faltava do nervo, sem contudo obter êxito, o que somente foi alcançado por Vanlair, em 1885, utilizando 3 cm de osso descalcificado (citado por Battiston (6)). Desde então, vários materiais, das mais diferentes composições, têm sido testados, alguns deles tendo sido relegados à história, por não apresentarem resultados satisfatórios.

A justificativa para que pesquisas na seara de reparação de nervos periféricos sejam conduzidas cada vez com mais intensidade reside no fato de que, em que pesem avanços significativos nas mais diversas áreas da Medicina, os resultados nas cirurgias de nervos não são encorajadores. Uma publicação de Meek e Coert classificou como “bons resultados” apenas 7% dos pacientes operados (10). Noutro estudo, Ijpma et al. (11) relataram que, numa média de 15 anos de seguimento, entre 20 e 30% dos pacientes se queixavam de algum nível de dor, sensibilidade ao frio e desconforto pela cicatriz, demonstrando que novas alternativas devem ser viabilizadas a fim de aumentar os percentuais de sucesso.

Os resultados da reparação neural imediata, naquelas condições ideais, são melhores do que nos casos de sutura retardada ou enxertia (12). Contudo, os resultados a longo prazo mostram que a recuperação pode ser considerada excelente em uma pequena porcentagem dos casos (13). Ou seja, mesmo numa ferida incisa, operada nos dias imediatamente seguintes à lesão, por um cirurgião treinado, com todo o arsenal terapêutico à disposição, não é possível ser dito que a recuperação será total. Evidentemente que naqueles casos nos quais há necessidade do uso de enxerto, os resultados são inferiores àqueles obtidos nas condições ideais (13). Uma das explicações seria o fato de existirem tecidos cicatriciais em dois locais, nos quais foram realizadas as suturas, em vez de um sítio único, como nos casos de sutura término-terminal, sem enxerto.

Além dessa desvantagem no uso de enxerto, há ainda os inconvenientes relacionados à morbidade trazida à área doadora. Seja no braço (n. cutâneo medial do antebraço), seja na perna (n. sural), as seqüelas são evidentes, principalmente aquelas relacionadas com a estética (cicatriz) e com a perda da sensibilidade da área inervada correspondente. Há que ser consignado que outro empecilho ao uso de enxertos autólogos consiste na diferença de diâmetro entre o segmento de nervo retirado e aquele ao qual será anastomosado.

A fim de diminuir esses problemas relacionados ao uso de enxertos autólogos de nervo, a ciência tem pesquisado ao longo dos anos o uso de materiais alternativos, desde condutos sintéticos (ácido poliglicólico, politetrafluoroetileno microporoso, silicone e polietileno) (7) até os naturais (artérias, veias, veias combinadas com músculos ou nervos, fibras musculares desnaturadas, bainhas sinoviais, derivados de tubos amnióticos pré-fabricados e tubos neurais vascularizados) (7). Tubos derivados do próprio epineuro também são descritos, habitualmente na forma de deslizamento do segmento de epineuro proximal em direção distal (14). Utilizar a parte distal do tecido epineural para essa finalidade também tem demonstrado resultados preliminares satisfatórios (15), o que motiva a continuidade do estudo.

Nesse sentido, este estudo foi idealizado com o objetivo de comparar os efeitos histomorfométricos da cicatrização e regeneração em nervos isquiáticos de

ratos, submetidos a deslizamento epineural do coto distal e sutura microcirúrgica término-terminal, com relação aos seguintes dados:

1. contagem do número de fibras mielínicas;
2. análise da área das fibras axonais;
3. razão entre o diâmetro axonal e o diâmetro da fibra.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O cirurgião que se dedica às reparações de lesões nervosas depara-se cotidianamente com situações nas quais são exigidas decisões sobre reparo primário de um nervo, reparo secundário, como nos acidentes com arma de fogo, ou enxertia. Os defeitos segmentares dos nervos são geralmente tratados por métodos que utilizam enxertos autólogos, habitualmente coletados de áreas com menor importância em termos de sensibilidade, como a face medial do braço (n. cutâneo medial do antebraço) ou a face lateral da perna (n. sural). Embora apregoadas como áreas menos nobres, é inegável que a retirada de uma parte de um nervo trará seqüelas, principalmente aquelas relacionadas à alteração da sensibilidade da área correspondente. Existe a possibilidade de formação de neuroma e presença de dor na região e cicatriz, comprometendo a questão estética e a funcionalidade. Além disso, deve ser considerado que, no caso de coleta do material do membro inferior, quando se está operando o membro superior, há modificação do procedimento anestésico e aumento do tempo cirúrgico. Também, deve-se levar em conta que o diâmetro do nervo a ser tratado nem sempre corresponderá ao tamanho do enxerto coletado, e que a reação cicatricial tende a ser exacerbada, podendo levar a um crescimento axonal para fora do tubo endoneural, uma vez que dois segmentos do enxerto, proximal e distal, foram suturados. Todos esses pontos negativos referentes ao uso de enxerto autólogo ainda são menores quando confrontados com os dados levantados por Meek et al.(10), que descrevem um baixo percentual (7%) de bons resultados em enxertia neural no membro superior.

Pode-se dizer que quanto maior o defeito a ser preenchido, maiores os problemas relativos à regeneração. A longa distância possivelmente dificulta a difusão dos fatores químicos associados à recuperação neural entre os cotos do nervo.

Maus resultados em cirurgia de nervo podem ser em parte atribuídos à falha da técnica em si, mas outros fatores devem ser considerados. Uma equipe cirúrgica treinada, que seja especializada nesses procedimentos, possivelmente obtenha melhores resultados do que outra sem a mesma experiência, apesar de não haver

evidência científica que suporte essa afirmação³. Outro componente que pode levar a maus resultados é a presença de um leito receptor em más condições. Sabe-se que as primeiras horas em que um nervo é enxertado sua nutrição se dá por difusão pelos tecidos ao redor. Logo, quanto maior o dano prévio ao leito, menor a chance de recuperação (10). Essa premissa levou ao desenvolvimento de enxertos livres vascularizados, cujos resultados podem ser melhores nos defeitos superiores a 6 cm (16). Há que se considerar outros dois fatores importantes quando o assunto é regeneração nervosa: idade do paciente e tempo de lesão. Quanto maior o período decorrido entre a data da lesão e a da enxertia, piores são os resultados (17). Também, quanto maior a idade do paciente, piores os resultados (18), reservando-se os melhores benefícios às crianças, pela maior facilidade que tem o cérebro de se adaptar a novos impulsos aferentes (10).

Assim, tem-se que enxertia autóloga de nervo é a técnica de eleição para cobertura de defeitos segmentares, mas ainda está longe da perfeição (10). E são justamente esses obstáculos que justificam e impulsionam o desenvolvimento de alternativas aos enxertos retirados do próprio paciente. Nas três últimas décadas, ganharam força as técnicas que envolvem o uso de tubos, artificiais ou biológicos, que conduzam os axônios em direção ao coto distal. As potenciais vantagens desses materiais são a ausência de cicatriz em outro local, a preservação da sensibilidade do local de onde seria retirado o enxerto, e o menor tempo cirúrgico. Estudos com condutos biológicos, como veias, têm demonstrado bons resultados (19) (20) (21) (22) (23), porém têm a desvantagem de ter que ser abordado outro sítio para a retirada da veia a ser implantada.

Um substituto viável que atualmente apresenta aplicação prática é o conduto artificial à base de ácido poliglicólico. Aprovado nos EUA para uso nos pacientes, esse material tem se mostrado viável em defeitos pequenos (24), pois propicia a regeneração nervosa ao mesmo tempo em que ocorre a sua degradação pelo organismo, o que leva a uma série de vantagens, principalmente as relacionadas à eliminação de eventuais obstáculos à continuidade do crescimento do nervo – problema enfrentado pelos condutos que não se degradam, como o Politetrafluoroetileno (PTFE). Ademais, o fato de não necessitar intervir em outro

³ Meek et al. (2005) sugeriram que fosse limitado o número de cirurgiões aptos a realizar essas cirurgias.

local para retirar o enxerto faz com que o conduto à base de ácido poliglicólico seja uma alternativa viável ao preenchimento dos defeitos segmentares neurais. Contudo, ainda se busca o substituto ideal, ou seja, aquele que produza a mínima reação tecidual cicatricial, baixa morbidade, com máxima recuperação neuronal e funcional.

A título de Revisão de Literatura⁴, será revisitada a anatomia do nervo periférico e, em seguida, a descrição das diferentes técnicas de reparo neural existentes. Os enxertos de veias estão entre os que ganharam mais aplicabilidade prática (25). Essa popularidade advém dos resultados alcançados, que são similares àqueles nos quais são utilizados enxertos autólogos de nervo. Porém, esses bons resultados são demonstrados somente naqueles defeitos de comprimento inferior a 3 cm, haja vista que os axônios regenerados não são capazes de alcançar o coto distal por causa da fibrose e do colapso da veia interposta (26). Entre os enxertos artificiais, o material desenvolvido e aprovado para uso em humanos é o tubo à base de ácido poliglicólico, que tem alcançado índices satisfatórios de bons resultados (24).

Buscando um substituto para os enxertos de nervos autólogos, que mantenha as características de idêntico diâmetro entre os cotos, passível de evitar a morbidade ocasionada pela retirada de um enxerto em outro local, que possibilite a aplicação de poucos pontos de sutura e, finalmente, que promova a manutenção dos potenciais neurotróficos, propiciando uma melhor regeneração neuronal, Atabay et al.⁵ descreveram uma técnica na qual um segmento do epineuro do coto proximal era deslizado e anastomosado no coto distal, possibilitando, assim, o preenchimento do defeito neural. Nos estudos ulteriores, modificaram o procedimento e fizeram a inversão do epineuro, ou seja, o deslizamento epineural era realizado, mas o epineuro era invertido ao encontrar a parte distal do coto proximal, e assim anastomosado ao coto distal (14). Apesar dos bons resultados, ressaltaram os autores ser possível a ocorrência de uma alteração na

⁴ Pesquisas com os termos “nerve”, “nerve morphometry”, “nerve regeneration”, “axonal growth”, “guidance tubes”, “nerve repair”, foram realizadas nas bases de dados Pubmed-Medline, Scielo e Lilacs.

⁵ (27. Atabay K, Hong C, Heil BV. The use of sliding epineural sheath tube for repair of peripheral nerve defects. Surg Forum. 1995;45:719-22.

microvascularização do coto proximal, o que poderia impor obstáculos à regeneração axonal.

2.1. ANATOMIA DO NERVO PERIFÉRICO

O conhecimento da anatomia normal de um nervo periférico é fundamental para entender como ocorre a regeneração nervosa. Cada neurônio tem um corpo celular no qual seu núcleo é localizado, e alguns processos (ou dendritos). Um desses processos, geralmente muito maior que os demais, é o axônio ou fibra nervosa, que é o responsável pela transmissão dos impulsos elétricos. Cada nervo periférico, constituído por várias fibras nervosas, é envolto por um epineuro, localizado externamente. O epineuro é uma bainha composta de tecido conjuntivo areolar e vasos sanguíneos dispostos de modo longitudinal. O suplemento sanguíneo aos nervos é farto, mas uma lesão pode causar vários tipos de alterações neurais (28).

Conforme o ensinamento de Keynes e Aidley (29), as fibras nervosas ocupam entre 25 a 75% da área seccional de um nervo, dependendo do nervo e de sua localização. Os vertebrados têm dois tipos principais de fibras nervosas: mielínicas e amielínicas. A fibra mielínica é a que transmite os impulsos com maior velocidade, podendo medir de 1 μm a 30 μm de diâmetro, enquanto o diâmetro das amielínicas varia de 0,2 a 3,0 μm . A maioria das fibras do sistema autônomo são amielínicas, uma vez que transmitem impulsos derivados de temperatura e dor, por exemplo, o que não demanda uma rápida resposta. Nos invertebrados, ilustrativamente, a quase totalidade deles apresenta somente fibras amielínicas, cujos tamanhos podem chegar a 500 μm ou 1000 μm quando são estimuladas a desempenhar uma rápida condução.

Todas as fibras nervosas consistem essencialmente de um cilindro longo de citoplasma, o axoplasma, circundado por um tecido eletricamente estimulável denominado membrana neural. Essa membrana também contém em sua estrutura as células de Schwann, as quais envolvem o cilindro de maneira variável nos diferentes tipos de fibras. Por exemplo, no caso do nervo olfatório, uma célula única

de Schwann serve como um suporte multicanal envolvendo pequenos axônios. Mas em geral, cada célula de Schwann suporta um pequeno grupo de 6 a 12 axônios. Em todas as fibras amielínicas a membrana axonal é separada da membrana da célula de Schwann por um espaço de aproximadamente 10 nanômetros de largura, às vezes citado como mesaxônio. Esse espaço é uma comunicação livre com o espaço principal extracelular do tecido, e permite uma transmissão uniforme do estímulo elétrico.

As fibras mielínicas são eletricamente isoladas pela bainha de mielina, presente em toda sua extensão, exceto no nódulo de Ranvier. Nos nervos periféricos, a bainha de mielina é coberta por uma célula de Schwann que repetidamente envolve o axônio, formando camadas concêntricas de membrana celular. No nódulo de Ranvier, essas camadas deixam um espaço entre uma e outra, através do qual é possível a comunicação entre a membrana axonal e o fluido extracelular. A resistência elétrica entre os nódulos de Ranvier é relativamente baixa, ao passo que a resistência entre dois pontos (nódulos), é alta por causa do efeito isolante da mielina. A diferença entre os nódulos e internódulos na questão da acessibilidade ao meio externo é a base para o mecanismo saltatório de condução das fibras mielínicas, o que as capacita a conduzir impulsos até 50 vezes mais rápido do que uma fibra amielínica do mesmo diâmetro.

No nervo periférico, as fibras mielínicas são cobertas por uma estrutura delgada, chamada neurilema. Os núcleos da célula de Schwann são encontrados justapostos ao neurilema, no ponto médio de cada nó. O tecido conjuntivo fibroso que separa as fibras individuais é conhecido como endoneuro. As fibras são agrupadas em feixes pelo perineuro, e os vários feixes formam um tronco circundado pelo epineuro.

Grupos de axônios se organizam em feixes, chamados fascículos. Um fascículo contém vários axônios e é rodeado por um tecido denominado epineuro. O diâmetro aproximado de cada fascículo varia de 0,04 mm a 3 mm. Vários fascículos são circundados por um epineuro e entremeados por um epineuro interfascicular. (30).

Os nervos periféricos são subdivididos nos seguintes tipos: monofascicular, oligofascicular e polifascicular. Os monofasciculares são aqueles compostos por

fibras longas, únicas, contendo várias fibras nervosas em seu interior, sendo ou sensitivas, ou motoras. Um exemplo é o ramo terminal de um nervo digital. O tipo oligofascicular consiste de poucos fascículos e podem conter fibras mistas (sensitivas e motoras), como por exemplo, o nervo ulnar na região do cotovelo. Os nervos polifasciculares são compostos por vários fascículos pequenos, e a função pode ser tanto em termos sensitivos quanto motores. Na verdade, essa classificação baseia-se na topografia em que determinado nervo é examinado. Um mesmo nervo pode apresentar características polifasciculares na região da axila, e monofascicular no hálux.

O objetivo de uma operação de nervo é restaurar o conduto para que haja a regeneração axonal. Conforme descrito anteriormente, esse reparo pode ser feito por sutura ou enxertia. Se o coto proximal está acentuadamente lesado ou se não há continuidade entre o coto e a medula, então a transferência de outros nervos para o coto distal pode ser possível. Se o coto distal estiver lesado, pode ser realizada implantação de nervos direto no músculo (neurotização muscular) (13).

Tudo dependerá das condições clínicas apresentadas pelo paciente, o tipo de nervo e o grau de tensão no local da sutura. A tensão, por sua vez, sofre influência do tamanho do defeito a ser preenchido, a possibilidade de excursão longitudinal, a época do reparo neural, a localização e a natureza da lesão.

Há situações nas quais é possível ganhar-se comprimento do nervo apenas pelo movimento de uma articulação. Por exemplo, no membro superior, quando o punho e os dedos estão estendidos, o nervo mediano move-se aproximadamente 7,4 mm. Ao fletir-se o cotovelo, entretanto, ocorre um movimento médio de 4,3 mm. Esse conhecimento é importante pois deve se levar em conta a excursão do nervo ao se programar uma enxertia. Se há um defeito de 3 cm, e se o cirurgião conhece que a excursão daquele nervo, naquele local, gira em torno de 1,5 cm, então o comprimento do enxerto será de 4,5 cm, e não de 3 cm, como se poderia supor. Ou seja, além dos conhecimentos estáticos, locais, deve-se ter em mente as alterações dinâmicas das estruturas nervosas.

2.2. PRINCÍPIOS GERAIS DA REGENERAÇÃO E REPARO NEURAL

Conforme os ensinamentos de Ide (30), quando ocorre uma lesão, a cicatrização do nervo dependerá de vários fatores. Assim, o neurônio deve ter permanecido viável, o sítio distal à lesão tem que estar em boas condições e o axônio tem que reinervar seu alvo, o qual deve aceitar a reinervação e recuperar-se da atrofia ocasionada pela denervação (31). Tanto as fibras axonais mielínicas quanto as amielínicas são rodeadas por células de Schwann, que são cobertas por uma lâmina basal. Essa lâmina basal, que fica em contato com o epineuro, é uma matriz extracelular que age como um esqueleto para células epiteliais e neurais, e seus componentes também promovem a regeneração.

Nas fibras que possuem mielina, cada célula de Schwann forma sua própria bainha de mielina internodal, que são separadas por um nódulo de Ranvier. Mas esses nódulos não interrompem a continuidade da lâmina basal, que é linear ao longo de todo o axônio, como nas fibras amielínicas. Após uma lesão, um processo denominado “Degeneração Walleriana” ocorre no segmento distal. Isso significa que o conteúdo da fibra nervosa passa a ser fagocitado, tanto pelas células de Schwann quanto pelos macrófagos (32). Estes últimos contribuem para a regeneração, pois removem substâncias inibitórias associadas com a mielina e indiretamente liberam fatores (mitógenos para células de Schwann e fibroblastos, além de citocinas) que estimulam o reparo celular. As citocinas estimulam a síntese de fatores de crescimento e moléculas de adesão pelas células não-neuronais da bainha de mielina e pelas células endoteliais dos vasos (33).

A partir desse momento, as células de Schwann multiplicam-se, formando um cordão (coluna de células de Schwann ou Bandas de Büngner) dentro da lâmina basal (34). As mitoses das células de Schwann são correlacionadas com a invasão de macrófagos no coto distal. Esses macrófagos que digeriram a bainha de mielina liberam mitógenos incluindo várias citocinas, mitógenos adenosina monofostato cíclico-dependentes e fatores de crescimento de fibroblasto (33). As células de Schwann proliferadas mudam seu fenótipo de mielínica para amielínica, por meio de mecanismos de regulação de várias proteínas, como fatores de transcrição,

fatores neurotróficos, moléculas celulares de adesão e componentes da membrana basal, incluindo laminina, fibronectina, vários proteoglicanos e colágeno (5).

Os axônios regenerados são produzidos no nódulo de Ranvier, vindos do coto proximal em direção ao distal da lesão, através das necessárias Bandas de Büngner, até o órgão-alvo (35). Os brotos do nódulo de Ranvier estendem-se por seus próprios túneis de lâmina basal no segmento proximal, atravessam o estreito caminho de tecido conectivo entre o coto proximal e distal, e finalmente entram no segmento distal. Todos os brotos estendem-se através do espaço entre a lâmina basal e a membrana plasmática da célula de Schwann ou da bainha de mielina no coto proximal. A bainha de mielina que permanece como um túnel vazio após os axônios terem se degenerado não serve como conduto para o crescimento dos axônios em regeneração, de modo algum. Contrariamente, pois a bainha de mielina repele a adesão de axônios em regeneração (33). Esses axônios que estão se regenerando aderem-se à superfície interna da lâmina basal ou na membrana plasmática da célula de Schwann. Isso indica que substâncias favoráveis à adesão do axônio devem ser produzidas tanto na superfície interna da lâmina basal quanto na membrana plasmática da célula de Schwann.

Os axônios em regeneração geralmente são produzidos no nódulo de Ranvier localizado próximo ao coto proximal (5). O axolema nodal é um revestimento eletrodense, sendo que na região próxima à lesão ocorre o seu desaparecimento, dando lugar à protrusão da membrana plasmática para regenerar axônios. Esse brotamento de axônio geralmente contém vesículas de diferentes tamanhos, e conforme evolui para um cone de crescimento, o número de vesículas aumenta. E o número de vesículas é o que diferencia um axônio em brotamento de um cone de crescimento, pois este último apresenta uma abundância de vesículas e mitocôndria. Múltiplos brotos podem ser produzidos no nódulo, o que explica por que muitos axônios são encontrados dentro de uma única lâmina basal derivada de uma fibra de mielina no coto proximal (30).

Geralmente é ativado um mecanismo de transporte retrógrado, do coto proximal em direção ao corpo celular, que causa um aumento no metabolismo da célula nervosa (36). Mas pode ocorrer formação de brotos de nódulos de Ranvier no próprio local, sem a influência do corpo celular. Porém, esse crescimento é limitado, provavelmente por não haver suprimento necessário de constituintes para

o crescimento do corpo celular por meio do transporte axonal. Se, por alguma razão, algum axônio em regeneração contornar a coluna de células de Schwann (Büngner) e penetrar no compartimento de tecido conjuntivo, ele parará de crescer após percorrer poucos milímetros. Logo, a coluna de células de Schwann é o que propicia a regeneração axonal com um ambiente favorável para o crescimento. Ou seja, ela é a fonte de fatores tróficos. Além disso, as células de Schwann que se tornaram atrofiadas mantêm a sua capacidade de remielinizar os axônios na fase recente da cicatrização (34). Fatores neurotróficos, que incluem fator de crescimento neural (NGF), fator de crescimento cérebro-derivado (BDNF), neurotrofina 4/5 (NT 4/5), fator neurotrófico derivado da linhagem da célula da glia (GDNF) e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), são emitidos e liberados de tecidos-alvos e por células da glia, fibroblastos e macrófagos na vizinhança do corpo celular neuronal e do axônio (33).

O segmento distal e o próprio local da lesão também contribuem para a regeneração (37), e não apenas o segmento proximal, conforme haviam sugerido Waller e Ranvier (8). No local da lesão, onde há os cotos, fatores neurotróficos guiam os axônios através dos cotos. Isso ficou evidenciado no estudo de Saito et al. (38). Os axônios que encontram seu alvo são supridos por fatores tróficos, num processo conhecido como neurotrofismo. Discute-se que a regeneração falha quando há lesão com mais de 10 mm, pois os fatores neurotróficos não exercem seu papel adequadamente sobre os axônios proximais (33, 38).

Essas questões são relevantes na medida em que constituem uma das frentes das pesquisas a respeito de nervo. Encontrar métodos de tubulização eficiente, um dos propósitos do presente trabalho, é a outra vertente, mas que não pode ser estudada isoladamente. É provável que os resultados melhorem sobremaneira quando forem identificados e compreendidos todos os fatores extrínsecos responsáveis pelo crescimento neuronal, as células que os produzem, a sequência de eventos que ocorre durante a regeneração e a complexa via bioquímica observada nessas condições (39).

Alguns princípios devem ser obedecidos no tocante ao reparo de lesões de nervos. Primeiramente, a dissecação deve ser sempre realizada da região onde há tecido normal em direção à área lesada. Ao ser detectado o sítio cirúrgico específico, deve-se analisar se há condições de ser realizada uma sutura imediata,

término-terminal, ou se há tecido cicatricial ao redor dos cotos, que demande ressecção. Se esse for o caso, deve-se cortar o coto do nervo até o momento em que for possível serem visualizados fascículos íntegros. Um outro aspecto que deve ser observado é quanto ao uso de magnificação da imagem, usando microscópio ou lupa. Sem isso, não há como saber quando se atinge o nível ideal de secção do nervo ao se procurar pelos fascículos não-lesados. Também, operar a olho-nu dificulta a observação do epineuro, bem como sua apreensão com a pinça e a confecção dos nós. Com isso, consegue-se máximo cuidado com os tecidos, realizando uma dissecação suave, evitando-se também um número excessivo de pontos para coaptação dos cotos, pois quanto maior o número de nós, maior a reação cicatricial ao redor.

Várias técnicas podem ser utilizadas para o reparo da lesão nervosa, dentre elas o reparo epineural, o fascicular, o fascicular em grupo, a técnica por meio de enxerto autólogo e também as que utilizam condutos biológicos ou artificiais. A seguir, serão revisadas essas diversas possibilidades de tratamento.

2.2.1. Reparo epineural

A sutura realizada entre os epineuros dos cotos de um nervo lesado é a mais usada na prática. Desse modo, aproximam-se os elementos a se suturar, alinhando-os conforme os vasos longitudinais do epineuro, e promove-se a sutura. O reparo cirúrgico é realizado usando fios monofilamentares de nylon, variando entre 7-0 a 10-0 (13). Geralmente, realiza-se a sutura inicial com dois pontos, distantes 180 graus entre si, para evitar a rotação do segmento. Novos pontos são confeccionados, sendo a sutura ideal aquela que coapte completamente as bordas dos cotos, com o mínimo de pontos (40).

Caso não seja possível manterem-se os cotos unidos com um ponto de mononylon 8-0, então é possível que haja tensão excessiva no local, indicando duas soluções: 1) mobilizar o nervo, conforme as técnicas descritas previamente, ou 2) mobilizar a articulação adjacente, a fim de ganhar comprimento para o relaxamento. Se não for possível realizar-se o ponto sem tensão, então deve ser considerado o uso de enxerto, pois há melhor resultado quando comparados aos grupos feitos com tensão (41).

2.2.2. Reparo Fascicular em Grupo

Há nervos nos quais podem ser identificados grupos fasciculares individualmente, como, por exemplo, o nervo radial próximo ao cotovelo (onde se divide em interósseo posterior e superficial sensitivo). Nesses casos, identifica-se o epineuro interfascicular e realizam-se entre duas e três suturas para cada grupo de fascículos. Atribuem-se algumas vantagens a esse tipo de sutura, como melhor preservação do arranjo interfascicular e manutenção do suprimento sanguíneo.

2.2.3. Reparo Fascicular

O reparo fascicular é aquele no qual uma sutura perineural é realizada. O epineuro externo é deslizado, os fascículos são visualizados e suturados entre os cotos proximal e distal (1). Nesse tipo de sutura, o tecido conjuntivo e os vasos entre os fascículos são cuidadosamente dissecados, de modo a não lesar os fascículos. Deve-se, entretanto, remover uma certa quantidade de epineuro interfascicular a fim de poder separar os fascículos. Uma vez individualizados, duas ou três suturas com fio 10-0 ou 11-0 são feitas, distanciando-se entre 120 a 180 graus uma da outra. O ponto não pode ser muito tenso, senão poderá haver extrusão lateral do conteúdo interfascicular.

O reparo fascicular promove melhor alinhamento do nervo, e naqueles casos em que podem ser identificados fascículos sensoriais e motores (como em alguns reparos do nervo mediano e ulnar), o resultado é melhor do que se uma sutura epineural fosse feita (40). A principal desvantagem é que demanda muito tempo cirúrgico e aumenta o risco de cicatriz intrafascicular, em virtude da extensa dissecação.

2.2.4. Reparo Epineural *versus* Reparo de Grupos de Fascículos

Tanto os estudos clínicos quanto experimentais tentam demonstrar a superioridade de cada método. Experimentalmente, tem-se tentado demonstrar a especificidade da reinervação após o reparo epineural e fascicular em nervos isquiáticos de ratos. Brushart et al. (42) demonstraram que a sutura fascicular

promove uma melhor conexão entre as unidades periféricas do nervo. Porém, há estudos que não demonstram diferenças nos resultados clínicos (43) (44).

A sutura epineural é mais fácil, mais rápida e demanda menos manipulação das estruturas neurais, principalmente aquelas relacionadas ao suprimento sanguíneo. A crítica advém do fato de os resultados clínicos (recuperação funcional total) raramente serem satisfatórios com esse tipo de técnica (2). Provavelmente, esses maus resultados derivam da dificuldade de se alinharem os fascículos, o que leva a uma desorganização e a um aumento do tecido fibrótico entre os cotos.

As suturas do tipo fasciculares e as fasciculares em grupo têm maior potencial de regeneração das fibras nervosas, mas requerem um maior tempo de cirurgia, maior risco à vascularização interfascicular e maior potencial de lesão às fibras interfasciculares (45). Por essas razões, é difícil comparar clinicamente esses tipos de sutura (fascicular e fascicular em grupo) com as suturas epineurais. Se fosse possível promover uma sutura fascicular com o máximo alinhamento dos fascículos, com o menor trauma aos tecidos ao redor da sutura, a fim de diminuir o potencial de formação de cicatriz, provavelmente os resultados clínicos superariam os da sutura epineural.

2.2.5. Enxerto Neural

Se não for possível a coaptação dos bordos de cotos neurais de um modo primário, o uso de enxerto de nervo estará indicado (46) pois a sutura sob tensão produz piores resultados do que aquelas com uso de enxerto (28). Assim como nas suturas primárias, devem ser preparados os cotos, removendo-se o tecido cicatricial e promovendo-se cortes até que fibras saudáveis apareçam.

Preconiza-se que sejam alinhados os fascículos motores e sensitivos, entre os cotos distal e proximal, o máximo possível (13). Mas deve-se considerar que isso é difícil, principalmente no segmento principal, onde há uma mistura maior de fibras. Para realizar a sutura, deve-se colocar o segmento a ser enxertado no local e passar a agulha pelo epineuro do enxerto em direção ao epineuro interfascicular e ao restante do perineuro. Também é importante que os enxertos sejam colocados num local bem vascularizado para permitir a sua integração e diminuir a formação de tecido fibrótico.

Outro componente que pode levar a maus resultados é a presença de um leito receptor em más condições. Sabe-se que as primeiras horas em que um nervo é enxertado sua nutrição se dá por difusão pelos tecidos ao redor. Logo, quanto maior o dano prévio ao leito, menor a chance de recuperação (10). Essa premissa levou ao desenvolvimento de enxertos livres vascularizados, cujos resultados podem ser melhores nos defeitos superiores a seis centímetros (16).

2.2.6. Reparo Primário Direto *versus* Enxertia

Evidentemente, sempre que possível o reparo direto deverá ser realizado. Mas naquelas situações em que há tensão, ou perda de um segmento de nervo, o enxerto tem que ser usado, a fim de melhorar a regeneração axonal (47). Entretanto, a maior dificuldade para o cirurgião é decidir se uma tensão leve, ou moderada, é indicação para enxertia. Muitas vezes, durante uma cirurgia, depara-se com esse dilema, e o que se deve ter em mente é que a sutura sob tensão ocasiona uma proliferação de tecido conjuntivo dentro do nervo, que pode interromper a regeneração. Também, essa tensão pode produzir degeneração axoplásmica e formação de cicatriz. Esse tecido cicatricial, por sua vez, pode ser o responsável por uma má recuperação nervosa, haja vista que o axônio, ao se regenerar, pode penetrar nessa massa fibrótica, em vez de o fazer dentro de um fascículo (13).

2.2.7. Neurorrafia Término-lateral

A possibilidade de um nervo lesado ter a extremidade de um coto anastomosado à parede lateral do outro segmento existe desde 1895 (48). Viterbo et al. (48), entretanto, demonstram a viabilidade de implantar um nervo seccionado à parede lateral de um nervo sadio, sem remover o epineuro, viabilidade essa ratificada pelas evidências encontradas por McCallister et al. (49) e Zhang et al. (50). Trabalho de Matsuda et al. (51) evidenciou não haver diferenças funcionais significativas entre sutura término-terminal e término-lateral de ratos.

Tarasidis et al., (52) em outro estudo experimental com ratos, sugeriram que o emprego dessa técnica pode trazer uma baixa regeneração sensorial, o que tornaria sua aplicabilidade clínica limitada.

2.3. CONDUTOS USADOS NA SUBSTITUIÇÃO DE NERVOS

2.3.1. Conduitos de Origem Biológica

Entre os vários tipos de tubos biológicos descritos para preencher defeitos neurais segmentares, os vasos e os músculos esqueléticos são os que têm recebido maior atenção (35). Adiante, serão revisados os diversos conduitos biológicos.

2.3.1.1. *Conduitos de Veias*

Em 1909, Wrede, citado por Meek e Coert (7), descreveu um paciente com lesão que gerou um defeito de 7 cm nos nervos mediano, ulnar e cutâneo medial do antebraço. O nervo mediano foi então tratado com um enxerto de veia. Wrede relatou então que o paciente recuperou alguma sensação e movimento do polegar. O interesse por esse tipo de enxerto ressurgiu nos anos 80, com a demonstração de que resultados similares ao enxerto convencional poderiam ser alcançados (53). A seguir, outros autores, como Chiu e Stranch (54) concluíram que nos defeitos menores de 3 cm é possível obter-se alguma recuperação na sensibilidade, enquanto outros pesquisadores (19) e (20) advogam o uso para defeitos até 4,5 cm, ressaltando que quanto maior o segmento de veia, maior a chance de colapso da mesma. Ainda, Tang et al. afirmam haver uma melhor recuperação se fatias de nervo forem introduzidas no interior dos tubos de veia. No mesmo sentido, Calder e Green (21) descreveram bons resultados após usar conduitos neurais associados a músculo no interior do lúmen, mesma linha adotada por Fernandes et al. (55) e Battiston et. al (22), estes últimos demonstrando bons resultados em 85% dos casos, nos defeitos entre 0,5 e 6 cm. Pogrel e Maghen (56) aplicaram enxertos venosos a lesões de nervos linguais menores do que 5 mm e relataram alguma recuperação da sensibilidade na área correspondente. Melhores resultados nessa

modalidade de enxerto talvez possam ser produzidos valendo-se do tratamento prévio da veia com glicerol (57). Outra opção dentre as alternativas com tecido venoso está descrita como enxerto de veia invertida (*inside-out*), havendo opiniões favoráveis (58) (59), atribuídas ao colágeno e à laminina contidas na camada adventícia da veia, e posicionamentos contrários (60).

2.3.1.2. *Condutos de Artéria*

O primeiro estudo experimental de reparo neural utilizando-se um segmento arterial foi conduzido em 1891 por Büngner, operando um nervo hipoglosso de canino e obtendo sucesso (Büngner (61), apud Meek (7)). Porém, devido ao fato de artérias de diâmetro apropriado ser difíceis de ser vistas no mesmo indivíduo sem que sua coleta traga complicações, as pesquisas deixaram de focar essa modalidade de tratamento (6).

2.3.1.3. *Condutos Baseados em Músculo Esquelético*

Embora os relatos iniciais advenham de 1940, o interesse maior pelos tubos compostos de tecido muscular só ocorreu nos anos 80 (6). A justificativa para se experimentar fibras de músculo para substituir um segmento do nervo se deve às similaridades entre a lâmina basal muscular e os tubos endoneurais dos nervos degenerados, músculos esses que podem ou não passar por um processo de pré-degeneração para eliminar os materiais que porventura possam impedir a regeneração neural (62). Alguns estudos clínicos evidenciam bons resultados ao se utilizar esse método (63) (64).

2.3.1.4. *Condutos Baseados na Bainha Epineural*

Estudo conduzido por Snyder et al. ⁶, citado por Siemionow (66) ilustrou uma técnica em que uma neurorrafia em “manga” (*sleeve neurorrhaphy*) era usada para minimizar ou prevenir neuroma e facilitar a regeneração neural. Resumidamente, o

⁶ (65. Snyder CC, Browne E. Epineural cuff neurorrhaphy. J Bone Joint Surg Am. 1974;56:1092.

nervo isquiático era seccionado e o epineuro da margem livre do coto distal era levantado e enrolado para trás, distalmente. Ficavam expostos os fascículos do coto distal, que eram cortados. Com isso, formava-se um tubo semelhante à manga de uma camisa que serviria para o fechamento do espaço ressecado (67).

Outro estudo conduzido por Ayhan et al. (14) demonstrou bons resultados funcionais e histológicos nos ratos submetidos ao deslizamento epineural do coto proximal. Porém, nesse trabalho, em vez de apenas deslizar o epineuro (como no presente estudo), os autores inverteram o tubo do epineuro para promover a coaptação.

2.3.2. Conduitos de Origem Sintética

2.3.2.1. *Conduitos Inabsorvíveis*

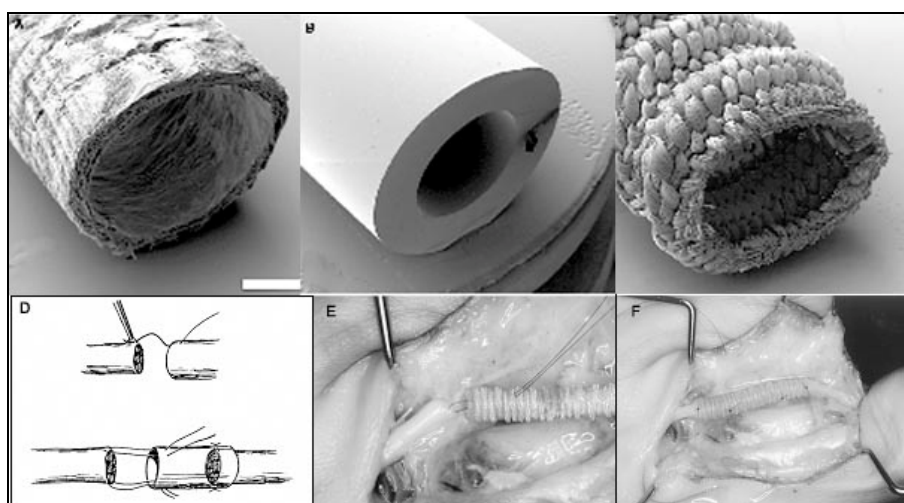
Desde o início do século XX já era possível encontrar estudos com substitutos artificiais para segmentos de nervo. Ao longo dos anos, vários tipos de técnicas foram utilizadas, com os mais diferentes materiais, como metais, gelatina, plástico, borracha (6). Nas últimas décadas, as pesquisas avançaram e relatos como de Braga-Silva (68) e Dahlin e Lundborg (69), assegurando boa recuperação nervosa, têm sido descritos. Esses materiais inabsorvíveis podem levar à fibrose no local e compressão nervosa (9), embora também haja evidência no sentido contrário (70), ou seja, pouca reação de corpo estranho em sete pacientes nos quais haviam sido colocados tubos de silicone e tiveram que se submeter a nova cirurgia.

O politetrafluoroetileno (PTFE) também tem sido utilizado clinicamente. Stanec e Stanec relataram bons resultados clínicos ao reconstruir um defeito de 29 mm no nervo ulnar no antebraço de um paciente (71). Noutro estudo, prospectivo e randomizado, os mesmos autores descreveram 43 pacientes tratados com PTFE, e sugeriram que esse conduto pode ser uma boa opção para tratamento das lesões nervosas (72). Noutra ponta, Pogrel et al. estudaram sete pacientes com lesão nos nervos lingual e alveolar inferior e concluíram que Gore-tex (PTFE) não foi efetivo para regeneração nervosa, exceto possivelmente para defeitos menores que 3 mm (56).

2.3.2.2. Condutos Absorvíveis

Após o término da regeneração neural entre os cotos proximal e distal, os guias usados como ponte tornam-se supérfluos e podem interferir negativamente na recuperação. Por isso, materiais degradáveis pelo organismo também têm sido descritos, tanto em estudos clínicos quanto experimentais (73)(figura 1). Dentre esses dispositivos, o ácido poliglicólico tem demonstrado ser efetivo como ponte para cobertura de defeitos neurais (74). Em 1999 foi aprovado pelo FDA um conduto sintético absorvível a base de ácido poliglicólico, e em 2000 foi publicado um trabalho multicêntrico, prospectivo e randomizado com 96 pacientes submetidos a tal cirurgia, evidenciando que os resultados para defeitos menores do que 4 mm os resultados com o uso do ácido poliglicólico foram superiores aos do grupo submetido a sutura término-terminal (91% dos pacientes recuperaram discriminação entre dois pontos a 3,7 mm, contra 49% no grupo da sutura convencional) (24). Também, mostrou-se superior na comparação com enxerto autógeno de nervo para defeitos de até 30 mm.

FIGURA 1 – Fotografias demonstrando três tipos de guias para nervos (no topo) – A: a base de colágeno; B: a base de polilactide/ caprolactona; C: a base de ácido poliglicólico (73); barra = 4 mm. Nas figuras embaixo (D, E e F) um exemplo da técnica para utilização de conduto à base de ácido poliglicólico (24)



Há alguns requisitos para um material servir como substituto biológico para os enxertos autólogos de nervo. Primeiramente, o ideal é que o dispositivo seja degradado rapidamente, de preferência, sincronizado com o crescimento axonal. Também, deve ser composto de material biocompatível, não-citotóxico, não-carcinogênico, não-mutagênico, não causar irritação local ou resposta alérgica sistêmica, e ser flexível e transparente, a fim de permitir a visualização dos cotos do nervo ao inseri-los no tubo (7). Além dessas características, o conduto ideal é aquele que tem o poder de evitar a lesão a outro sítio (doador), diminuir o tempo cirúrgico, diminuir a chance de transmissão de doenças infecciosas, não deixar resíduos permanentes no organismo, diminuir a tensão no local a anastomosar, aumentar a regeneração neural, e não necessitar de uso de medicamentos, como imunossupressores (7) (75).

Alguns estudos experimentais utilizando matriz extracelular, como o colágeno, demonstram resultados similares àqueles alcançados com enxertos autógenos. Outros materiais, como tubos à base de fator de crescimento neural, fator neurotrófico, fator de crescimento glial e células de Schwann também estão descritos, sendo este último bastante promissor (6), face aos resultados apresentados por Zhang et al.(76) e Rodriguez et al. (77). Há de se considerar também os estudos com células-tronco, que podem ser utilizadas para enriquecer os condutos a serem interpostos para preenchimento dos defeitos neurais (78). No entanto, não há evidência de que alguns bons resultados experimentais possam ser transpostos para a prática clínica (79).

3. MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Anexo I). Foram utilizados 20 ratos machos *Wistar*, com peso de $359,8 \pm 30,7$ g, com idade entre 12 e 16 semanas, obtidos e mantidos no biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Os animais foram agrupados e mantidos em gaiolas plásticas padrão, em condições ambientais controladas (luminosidade: 12 horas de ciclo claro/escuro) com livre acesso à água e ração peletizada. O experimento foi conduzido segundo as normas internacionais de ética na experimentação animal (*National Research Council*, 1996).

Incluíram-se os animais que não apresentavam quaisquer sinais clínicos de debilidade. Adotou-se como critério para eventual exclusão animais que porventura apresentassem mutilação, infecção ou perda significativa de peso.

3.1. GRUPOS EXPERIMENTAIS

3.1.1. O Projeto Piloto

Antes do início efetivo dos experimentos, seis animais provindos de outros estudos, e por isso, sujeitos ao descarte, foram utilizados para a verificação da viabilidade da técnica (grupo piloto). Na ocasião, seguindo-se o protocolo que será exposto adiante, pôde-se conferir a dificuldade no manejo dos tecidos, mormente o neural, uma vez que se trata de algo delgado, delicado e escorregadio, exigindo acurácia sob o microscópio. Assim, as dificuldades que adviriam puderam em sua maioria ser estudadas. Por exemplo, a confecção do corte transversal apenas na bainha epineural demandou cálculo preciso a fim de evitar a secção dos grupos fasciculares revestidos pelo perineuro. Uma vez o epineuro destacado de sua posição original, o deslizamento ocorria facilmente, mas cuidado deveria ser tomado a fim de não extrapolar o limite do coto, o que levaria à inutilização do tubo. Além disso, o epineuro é uma estrutura delgada, e que colaba facilmente ao ser destacado. Isso fazia com que a extremidade do tubo epineural devesse ser aberta

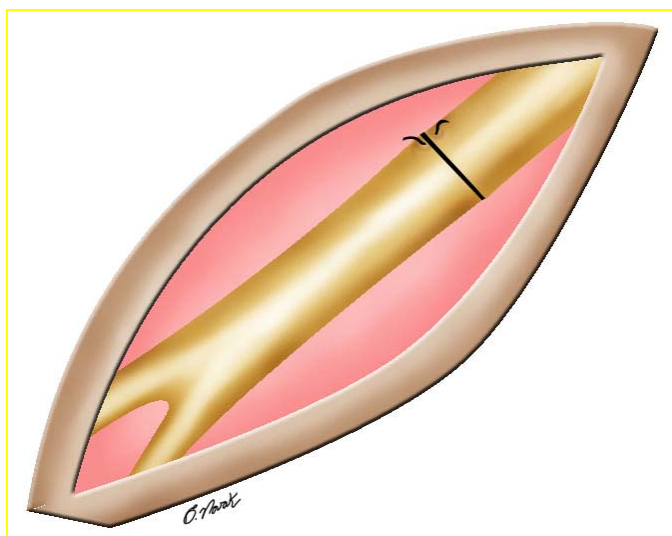
novamente, a fim de individualizá-la e realizar a sutura no coto adjacente. Caso isso não fosse feito, era possível que a extremidade do tubo fosse fechada completamente, pois a agulha atravessaria, em vez de uma, duas vezes, o epineuro, ocluindo completamente o tubo epineural, levando ao insucesso do procedimento. Esse treinamento no grupo piloto proporcionou visualizar previamente essas questões, o que permitiu evitá-las quando da operação nos ratos pertencentes ao grupo de estudo.

3.1.2. Divisão dos Grupos do Experimento

Os animais foram divididos em três grupos. O primeiro **grupo – Grupo Placebo** era composto por animais (n=6) que foram submetidos somente à exposição do nervo isquiático, sem que nenhum procedimento sobre essa estrutura fosse realizado.

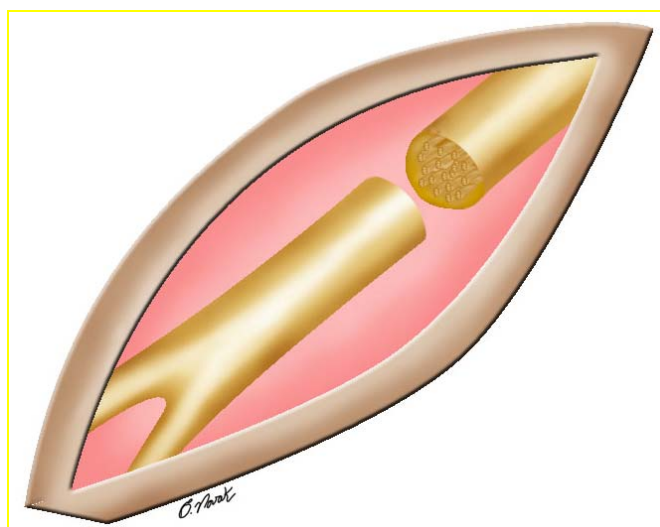
O segundo grupo - **sutura convencional (SC, n=7)** correspondeu aos animais submetidos à aplicação da secção transversa do nervo isquiático esquerdo, numa região distante aproximadamente 2 cm distal à emergência do mesmo, realizando-se a sutura epineural dos cotos com mononylon 10-0 (figura 2).

FIGURA 2 – Representação esquemática do local da incisão no nervo isquiático esquerdo do rato, com a passagem do ponto epineural



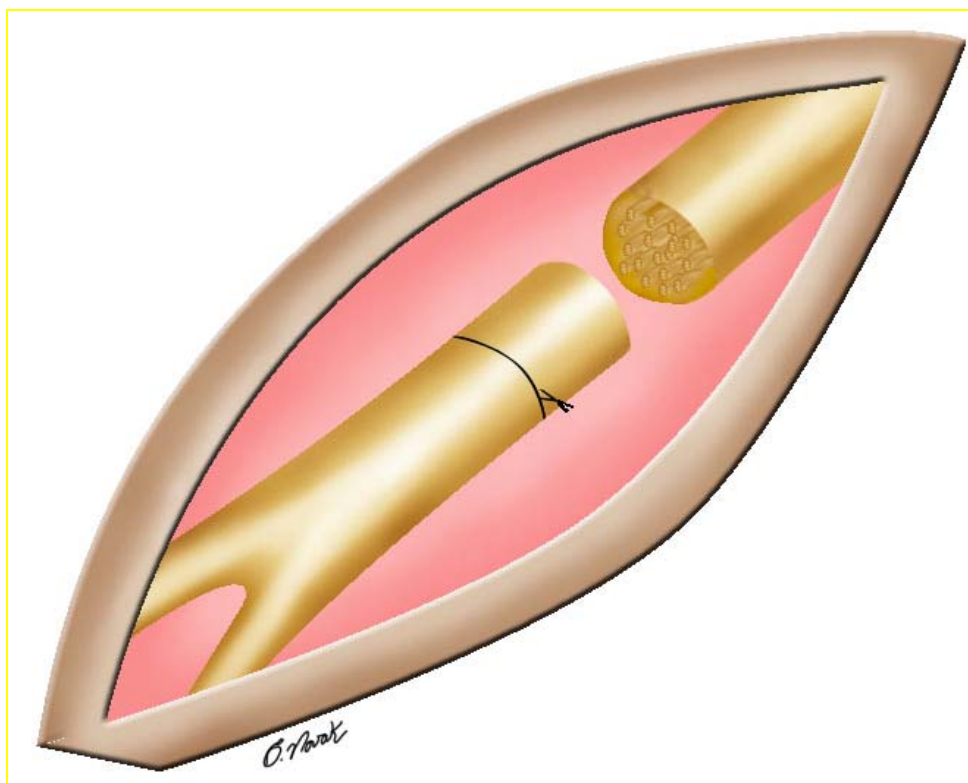
No terceiro grupo - **deslizamento epineural** (grupo DE, n=7) os ratos foram submetidos a uma secção transversa do nervo isquiático esquerdo com tesoura microcirúrgica, conforme a técnica aplicada para o grupo SC. Em seguida, foi feita uma ressecção de 5 mm de segmento de nervo, do coto distal (figura 3).

FIGURA 3 – Representação esquemática da secção nervo isquiático esquerdo do rato



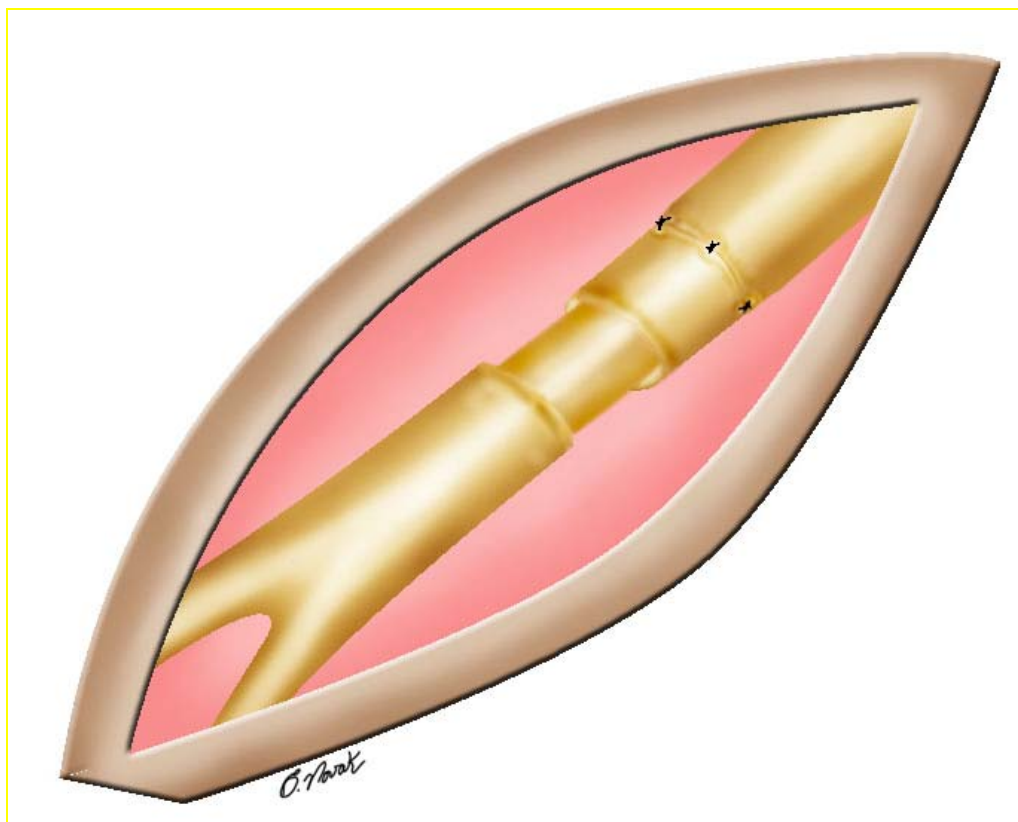
Para cobrir o defeito criado nesse grupo DE, um corte transversal ao longo do epineuro foi executado, distante 5 mm da extremidade desse coto distal, como representado na figura 4.

FIGURA 4 – Esquema demonstrando o local de secção (linha escura) do epineuro do nervo isquiático do rato



Após, procedeu-se o deslizamento do epineuro em direção ao coto proximal. Uma sutura então foi feita, do epineuro deslizado ao coto proximal do nervo (figura 5).

FIGURA 5 – Esquema ilustrando o deslizamento do epineuro em direção ao coto proximal, no qual a sutura foi realizada

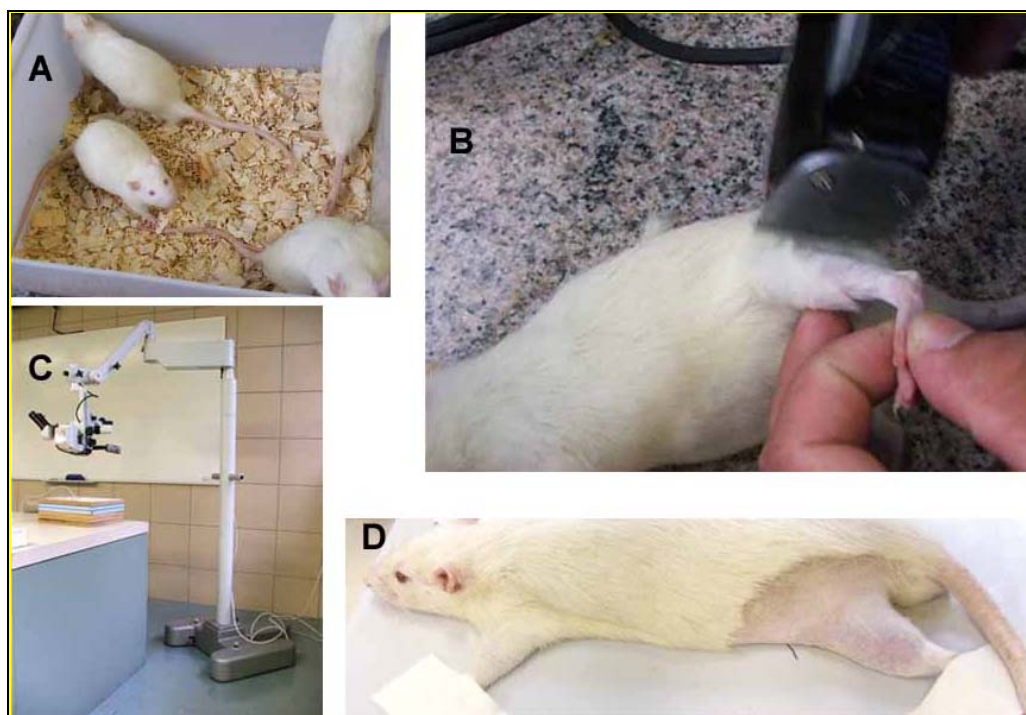


3.1.2.1. Descrição da Técnica Cirúrgica – Exposição do Nervo Isquiático

Para todos os procedimentos experimentais os animais foram previamente submetidos a anestesia intraperitoneal (IP) com Cloridato de Xylasina (12 mg/kg) (Anasedan®, Vetbrands) e Cloridato de Ketamina (95 mg/kg) (Vetanarcol®, König). A tricotomia da região caudal foi feita com aparelho elétrico (Panasonic®) (figura 6, B). Fixaram-se as patas dos animais com esparadrapo, na tábua revestida com fórmica, apropriada para dissecação (figura 6, D). Após a limpeza com solução degermante de gluconato de clorhexidina 2%, a incisão foi feita no lado a ser operado, transversalmente, na região glútea, com bisturi n. 3 e lâmina n. 15. O nervo isquiático foi exposto por uma incisão longitudinal póstero-lateral desde o grande trocânter até a região próxima ao côndilo lateral do fêmur (figura 7). Em seguida, foi realizada uma dissecação romba entre os músculos glúteos máximo e o quadríceps,

possibilitando a visão completa do nervo (80). A parte microcirúrgica do experimento foi feita com material apropriado para microcirurgia, consistindo de pinças, tesouras e microscópio cirúrgico (Kaps, Asslar Wetzlar, Germany) (figura 6, C). Fotografias foram feitas utilizando-se Câmera Digital (Finepix Fuji S5100).

FIGURA 6 – Caixa de acondicionamento dos animais (A); método de tricotomia da pata traseira do rato (B); estação de trabalho e microscópio cirúrgico (C); posicionamento do animal (D)



3.1.2.2. *Descrição da Técnica Cirúrgica – Sutura Convencional (SC)*

Com o nervo isquiático exposto, foram medidos aproximadamente 2 cm a partir de sua emergência na pelve dorsal. Seccionou-se o nervo nessa região com a lâmina de bisturi e um anteparo embaixo do mesmo. A seguir, aplicaram-se pontos

microcirúrgicos nas extremidades do enxerto, epineurais, separados a aproximadamente 90° , com mononylon 10-0 (figura 8) (67).

FIGURA 7 – Exposição do nervo isquiático por incisão longitudinal na região pósterolateral da coxa do rato

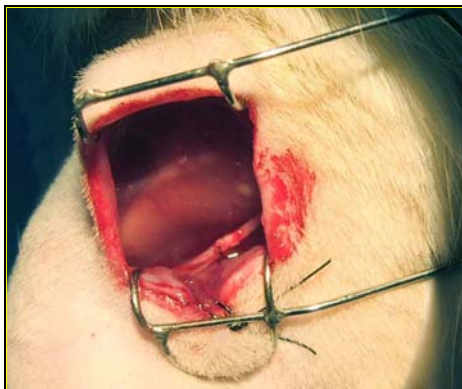


FIGURA 8 – Fotografia da anastomose entre os cotos proximal e distal em rato submetido à sutura convencional epineural



3.1.2.3. *Descrição da Técnica Cirúrgica – A Aplicação da Técnica em Estudo (DE) (15)*

Os mesmos passos de exposição do nervo foram seguidos. Mediu-se a distância de aproximadamente 2 cm do nervo, após a emergência na pelve dorsal, e foi realizada uma secção transversa com lâmina de bisturi nessa região. Mediu-se 0,5 cm e fez-se nova incisão proximal, ressecando-se esse segmento. Uma demarcação no coto distal foi feita, a 0,5 cm de sua extremidade, utilizando-se tesoura microcirúrgica. Em seguida, cortou-se o epineuro circunferencialmente. Isso permitiu que o epineuro ficasse livre e deslizasse, como um tubo, em direção ao coto proximal. O próximo passo foi a confecção de pontos de mononylon 10-0 (Ethicon, Johnson, com agulha cilíndrica), separados a aproximadamente 90°, unindo o epineuro deslizado ao epineuro intacto do coto proximal.

Pontos musculares foram feitos para aproximação (mononylon 5-0) e a pele foi suturada com pontos separados, com o mesmo fio e agulha.

3.1.2.4. *O Período Pós-operatório*

Os ferimentos cirúrgicos foram novamente lavados com gluconato de clorhexidina 2%. O controle analgésico pós-operatório foi feito com a administração de paracetamol 200mg/ml, 2 gotas em dois períodos ao dia por aproximadamente 7 dias, e diclofenaco resinato suspensão, diluindo-se 3 gotas na água com posologia similar.

3.1.2.5. *A Coleta de Material*

Após 12 semanas do experimento, uma nova cirurgia foi realizada. O mesmo protocolo de anestesia e preparo foi observado. Os nervos foram expostos e coletados. Foi ressecado um segmento de aproximadamente 0,2 cm, a uma distância (distal) de 1 cm do local da sutura e aproximadamente 3 cm da emergência do nervo isquiático. Para o grupo Placebo, a coleta foi feita 3 cm distal à saída do nervo. Os segmentos de nervos foram retirados e avaliados. Macroscopicamente,

não era possível observar nenhuma diferença entre os grupos submetidos às suturas e o grupo controle (*sham*), exceto pelos pontos de mononylon. Visualmente, não houve a formação de neuromas nos locais de sutura.

A eutanásia dos animais foi feita conforme os critérios da Associação Americana de Medicina Veterinária, de 2001, e aprovados, pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC). Tais normas preconizam que são aceitáveis as administrações de superdosagens de barbitúricos de 150mg/kg intraperitoneal para ratos Wistar.

Após a coleta, os nervos foram submersos em frascos de plástico de 1,5 ml, contendo solução fixadora de Karnovsky (2,5% de glutaraldeído, 4% paraformaldeído e tampão cacodilato a 0,1M). Essa solução foi mantida por 12 horas.

O material coletado, com as amostras dos nervos retirados, foi então encaminhado ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná. Nesse local foi feita lavagem com cacodilato 0,1M, por três vezes, e submersão das amostras em Tetróxido de Ósmio (OsO_4) aquoso 2% por 3 horas. Em seguida, os nervos foram lavados em água destilada por três vezes, e submersos em Acetato de Uranila a 2% durante toda a noite.

No dia seguinte, o material foi novamente lavado em água destilada, e iniciada a desidratação com acetona a 70%, por 10 minutos, repetindo-se o procedimento até a concentração de 100%. Nessa última concentração de acetona 100%, um maior período (20 minutos) foi transcorrido. O próximo passo consistiu na aplicação de acetona + resina 3:1 durante todo o dia, e de acetona + resina 1:1 durante toda a noite.

No dia seguinte (3º dia) as amostras foram submetidas a solução de acetona + resina 1:3 durante o período diurno e noturno. No quarto dia as amostras foram mantidas em resina pura, durante todo o dia, com o frasco aberto, e à noite incluídos em resina pura e colocados na estufa a 60°C por 3 dias.

Cortes histológicos transversais (0,5µm) foram feitos em ultramicrotomo (SORVALL, modelo MT-2) e corados com azul de toluidina (1% toluidina borax v/v). As fotomicrografias das lâminas histológicas foram realizadas em fotomicroscópio de Luz (Carl Zeiss Axiophoto, Germany) do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, Campus Curitiba.

3.2. ESTUDO HISTOMORFOMÉTRICO

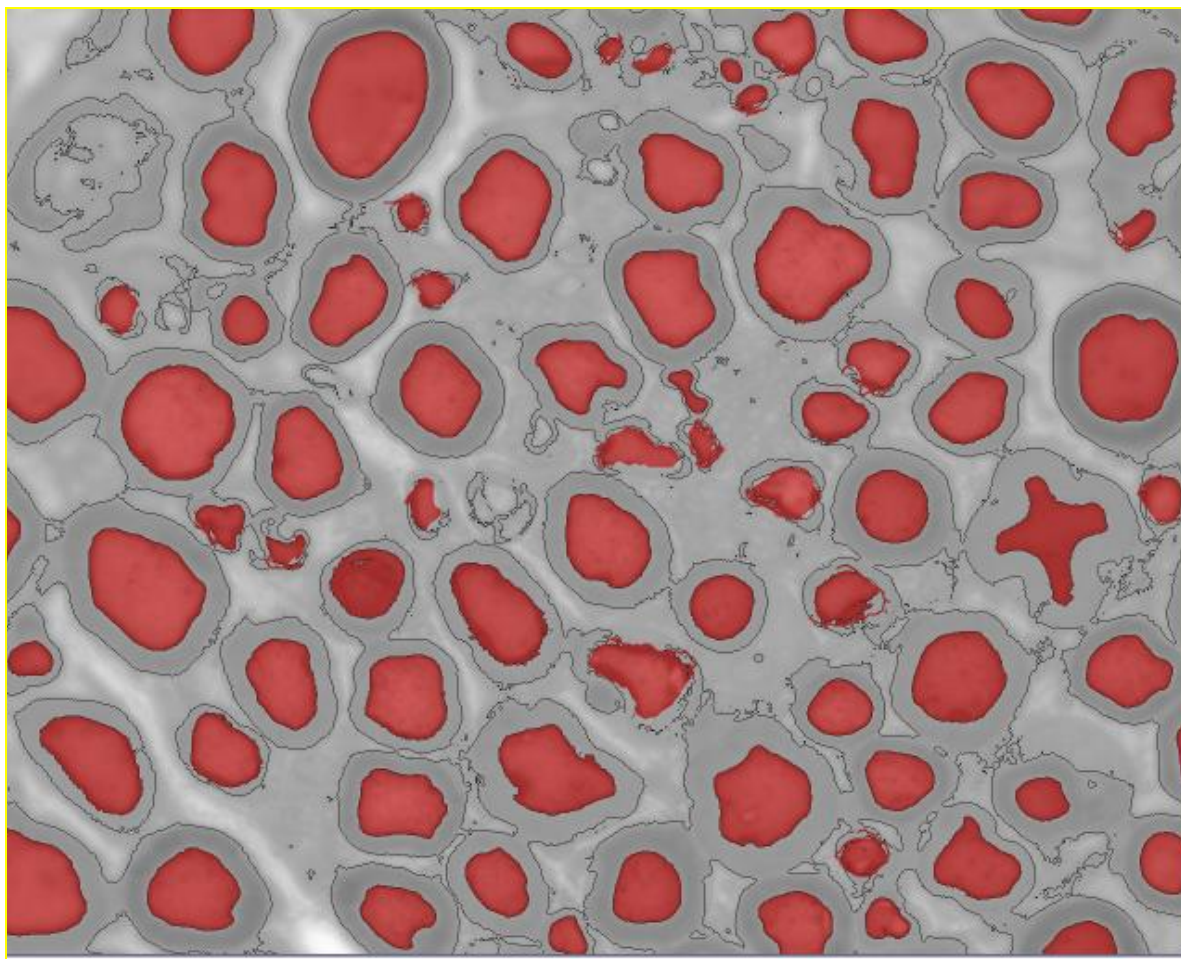
Cada corte foi fotografado em fotomicroscópio de Luz (Carl Zeiss) em objetiva de 100 vezes (Figuras 15). Posteriormente, as imagens foram analisadas, os campos selecionados e foram mensuradas as espessuras das bainhas de mielina, da fibra nervosa e da área da fibra axonal. De cada lâmina de cada nervo foram selecionados 8 campos, segundo o método descrito por Geuna et al. (81).

3.2.1. Obtenção dos Dados Histológicos

3.2.1.1. *Contagem das Fibras Mielínicas e Mensuração da Área do Axônio*

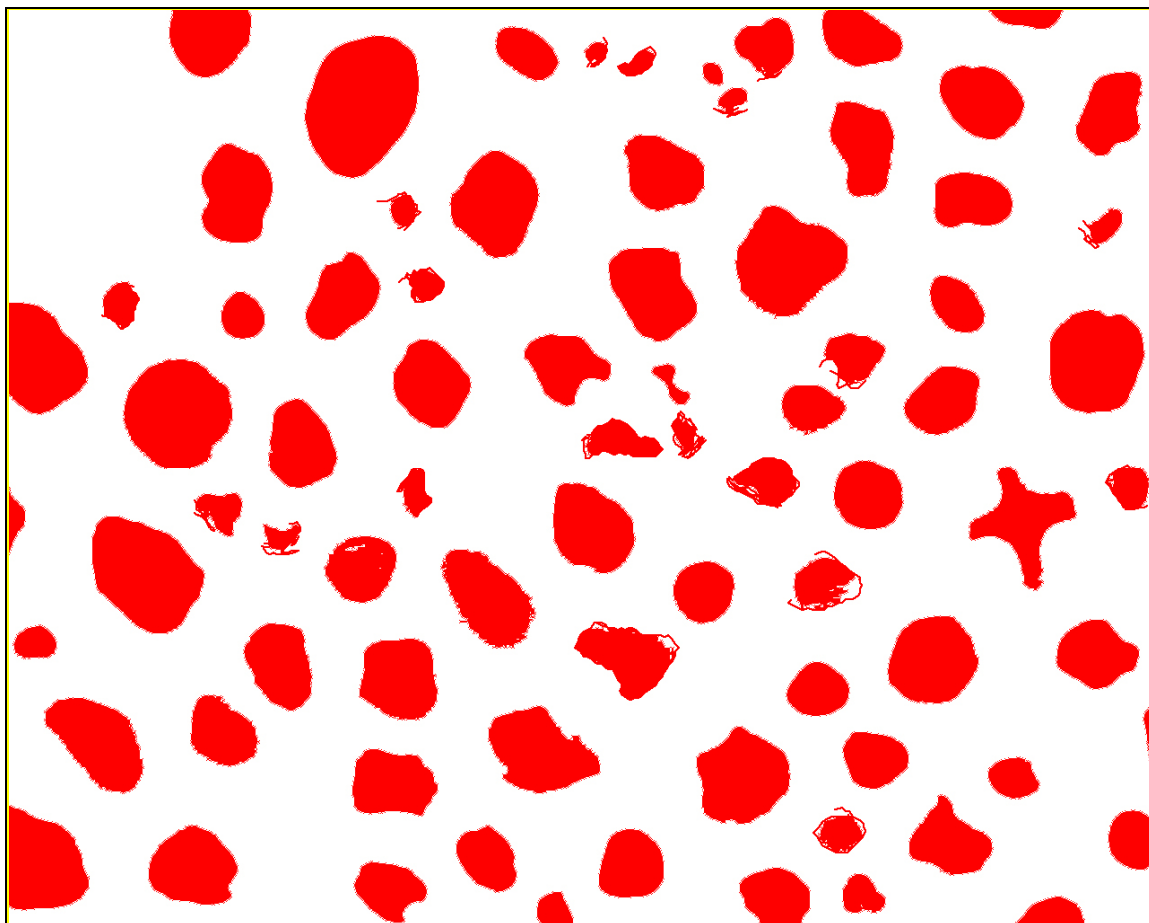
Com base nos estudos de Urso-Baiarda e Grobbelaar (82), utilizou-se o método semi-automático para cálculo das áreas do axônio. Para tanto, fez-se necessária a aplicação de software de tratamento de imagens (Photoshop CS, Adobe), que serviu para representar esquematicamente, sob a forma de desenho, a lâmina a ser estudada. Assim, após aberta a imagem, duplicou-se a camada e se aplicou um filtro (*stylize>trace contour*), que mostrou a figura sob a forma de desenho. Em seguida, diminuiu-se a opacidade da camada vetorizada para 50%, e passou-se a colorir (com a ferramenta *bucket*) somente o interior do axônio (figura 9).

FIGURA 9 – Preenchimento somente da porção representativa da área axonal por meio de ferramentas de software



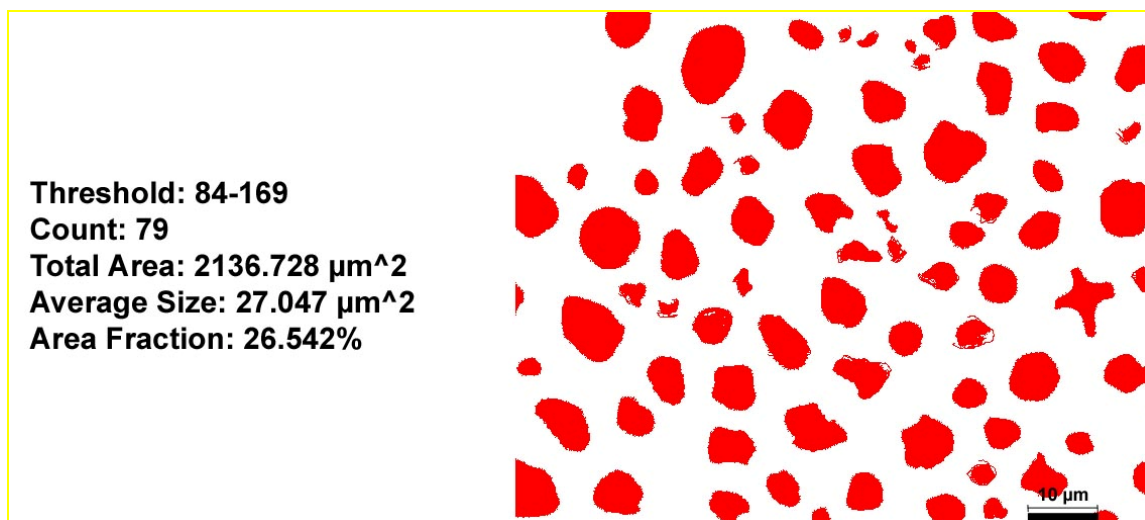
Após, selecionaram-se somente as áreas pintadas (*select color range*), e inverteu-se a seleção. Por último, apagaram-se todos os elementos selecionados, exceto as áreas demarcadas. O resultado final é a demarcação apenas do conteúdo da fibra axonal, com a subtração da bainha de mielina e do restante do conteúdo neural (figura 10).

FIGURA 10 – Exemplo de seleção das áreas das fibras axonais



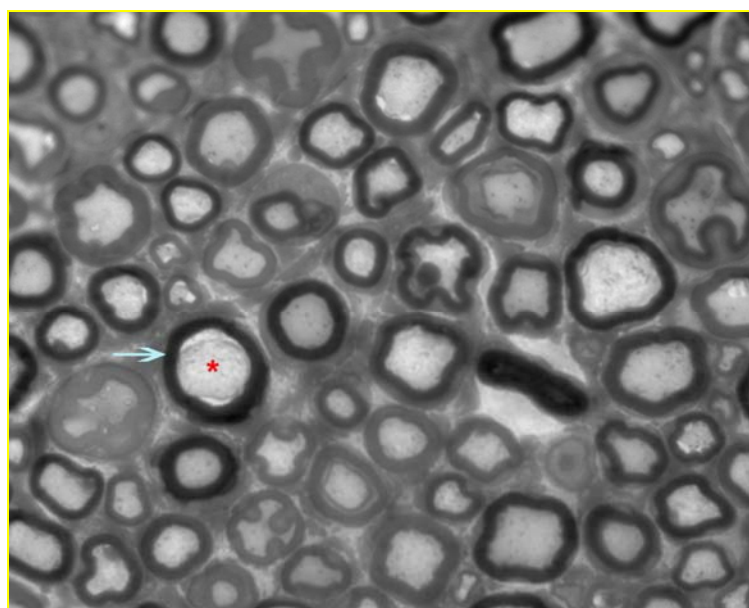
Para quantificar essa amostra, e efetivar o cálculo da área, lançou-se mão de um programa de análise de imagens (*ImageJ 1.37v – National Institutes of Health - USA*). Calibrou-se o programa conforme régua microscópica (Carl Zeiss), fotografada no mesmo microscópio em que foram obtidas as imagens das lâminas. Para cada micrômetro, o programa aferiu 12760 *pixels*. Seguindo-se os passos habituais (*type 8-bit, adjust threshold*), os elementos que interessavam (fibra do axônio) foram selecionados. Após a análise das partículas (*analyze particles*), a área foi calculada automaticamente (figura 11).

FIGURA 11 – Exemplo de cálculo da área da fibra axonal no programa ImageJ



As fibras medidas foram expressas em número de fibras por campo (figuras 11 e 12). Cada campo óptico, sob o aumento de 100x mediou 8.050 μm^2 , ou 0,008 mm^2 .

FIGURA 12 – Corte histológico transversal do nervo isquiático esquerdo de rato evidenciando fibras axonais mielínicas (objetiva de 100x), barra = μm . * representa a fibra axonal e a seta indica a bainha de mielina



3.2.1.2. Medida da espessura da bainha de mielina e do diâmetro da fibra axonal

Foi utilizado o método manual, por meio da medição individual das fibras das amostras selecionadas. Uma mesa digitalizadora (*Genius tablet*) serviu como meio para obtenção de seleções com maior precisão.

A razão G (Smith) refere-se ao quociente d/D , no qual “d” traduz o diâmetro da fibra axonal (interno) e “D” o diâmetro total da fibra, conforme figuras abaixo (figuras 13 e 14):

FIGURA 13 – Modo de obtenção da razão G [quociente d (diâmetro do axônio) / D (diâmetro da fibra do nervo)]

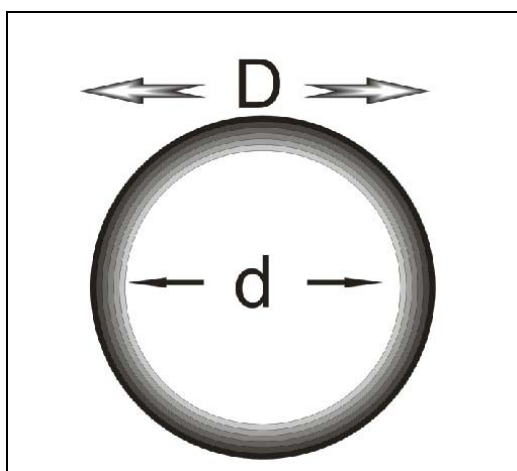
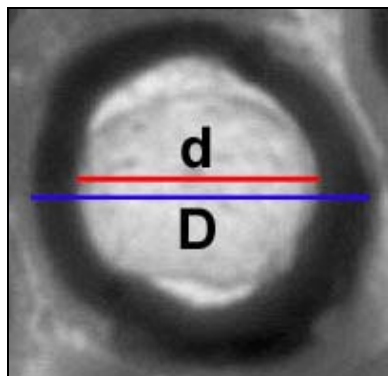


FIGURA 14 – Exemplo da medida da razão G. (d) representa o diâmetro da fibra axonal; e (D), o diâmetro total da fibra nervosa



3.2.1.3. *Análise dos resultados*

Os resultados estão expressos como a média \pm o desvio padrão, obtidos por meio do Microsoft *Excel*® 2007. A análise estatística foi realizada pela comparação entre os grupos experimentais dos resultados obtidos da análise da área de secção transversa das fibras axonais, do resultado obtido da divisão do diâmetro da fibra axonal pelo diâmetro da fibra nervosa e da contagem do número das fibras mielínicas por meio da análise de variância (ANOVA) *post hoc* Tukey, no programa *Statistica*® (Statsoft, USA). Os valores foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. NÚMERO DE FIBRAS MIELÍNICAS

A avaliação histomorfométrica quantitativa das fibras mielínicas não mostrou diferença significativa entre o grupo submetido à sutura epineural convencional (SC) e aquele no qual o deslizamento epineural (DE) foi realizado ($p>0,05$, ANOVA). Entretanto, ao se comparar esses dois grupos ao grupo placebo a diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,001$, ANOVA).

Nos animais cujos nervos isquiáticos foram submetidos à sutura convencional (SC) foram encontrados $102,53\pm2,98$ axônios por campo enquanto que naqueles em que foi feito o Deslizamento Epineural (DE) foram observados $98,60\pm2,90$ axônios. No grupo Placebo, o número de axônios foi de $80,93\pm2,38$. Na comparação entre os três grupos, não foram encontradas diferenças significativas estatisticamente entre o grupo SC e o grupo DE ($p>0,05$, ANOVA). Tanto o grupo DE quanto o grupo SC apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo Placebo – houve aumento do número de fibras mielínicas ($p<0,0001$, ANOVA), conforme gráfico 1, exemplificado na figura 15.

GRÁFICO 1 – Número de fibras nervosas mielínicas por campo \pm desvio-padrão dos ratos dos seguintes grupos experimentais: SC: grupo submetido a sutura convencional; DE: grupo no qual o deslizamento epineural foi realizado; grupo Placebo: ratos submetidos a cirurgia sem procedimento microcirúrgico no nervo. * $p < 0,001$ quando comparado com o grupo placebo (ANOVA)

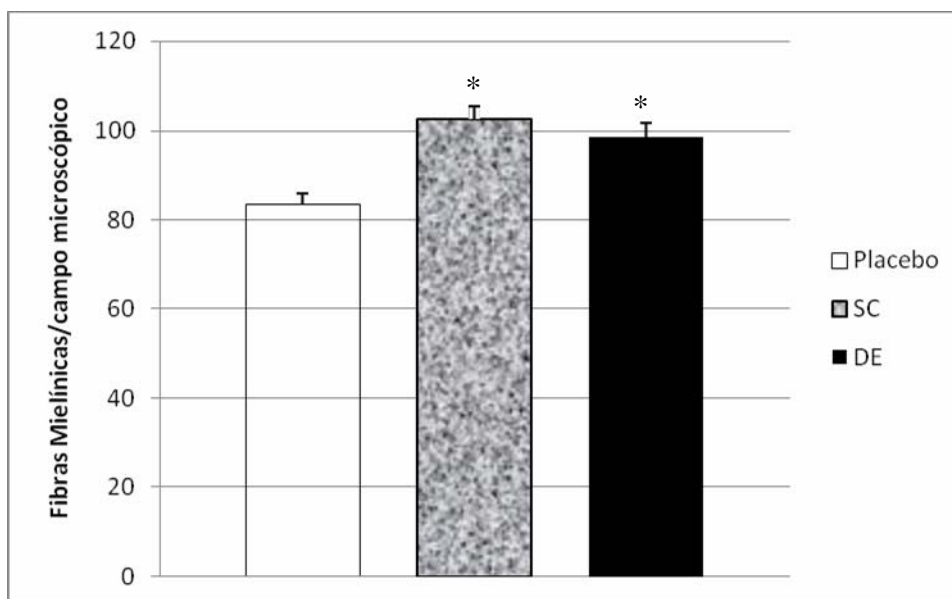
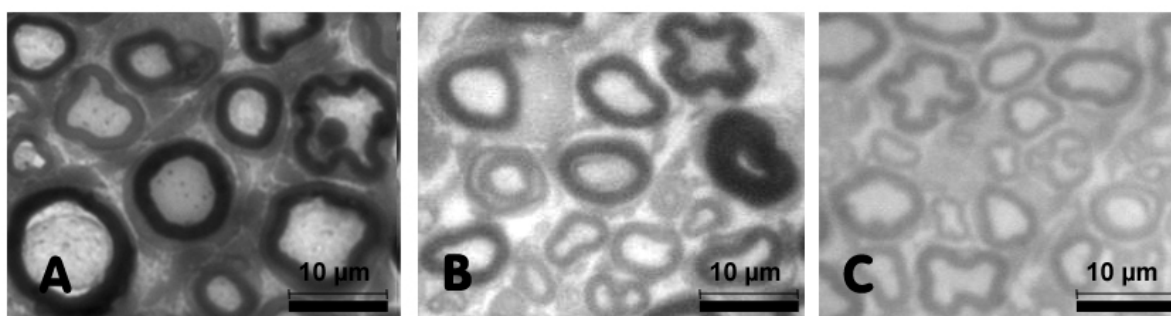


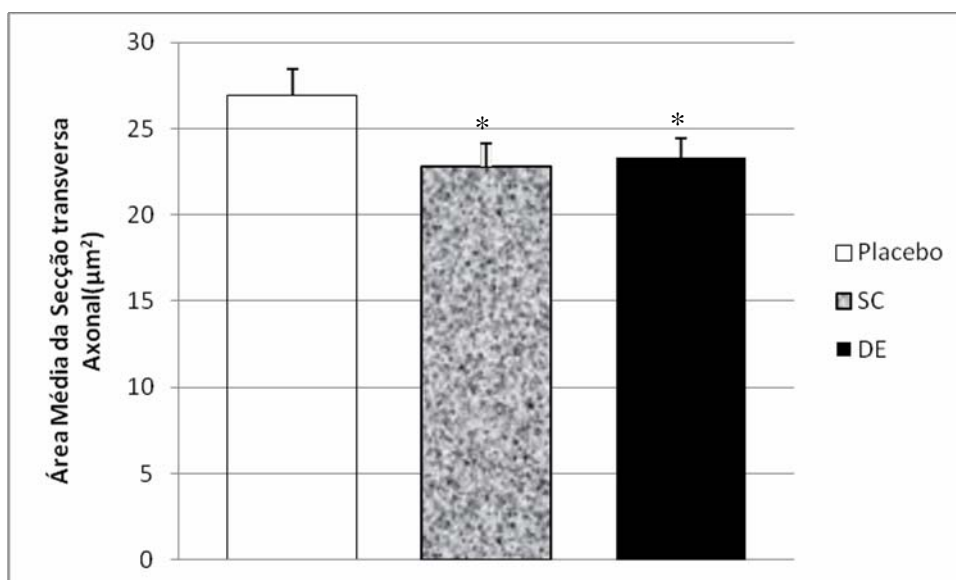
FIGURA 15 – Quadro comparativo histológico. Figura A: representa a fibra normal, proveniente do grupo Placebo; B: fibras mielínicas representativas do grupo SC; C: fibras do grupo DE. As fibras nervosas do grupo SC (B) e DE (C) apresentaram-se com maior concentração do que as do grupo Placebo (A). (objetiva de 100x, azul de toluidina)



4.2. ÁREA MÉDIA DAS FIBRAS AXONAIS

Com relação à área média da fibra axonal, o grupo SC apresentou $22,77 \pm 1,33 \mu\text{m}^2$, enquanto que no grupo DE foi constatado uma área média de $23,29 \pm 1,16 \mu\text{m}^2$. O grupo controle evidenciou $26,93 \pm 1,53 \mu\text{m}^2$ de área das fibras axonais. Entre o grupo SC e o grupo DE não houve diferença significativa ($p > 0,05$, ANOVA). Comparando-se o grupo SC com o grupo Placebo, e o grupo DE com o grupo Placebo, notou-se uma redução significativa nos valores ($p < 0,001$, ANOVA). A distribuição das médias de cada grupo experimental está representada no gráfico 2.

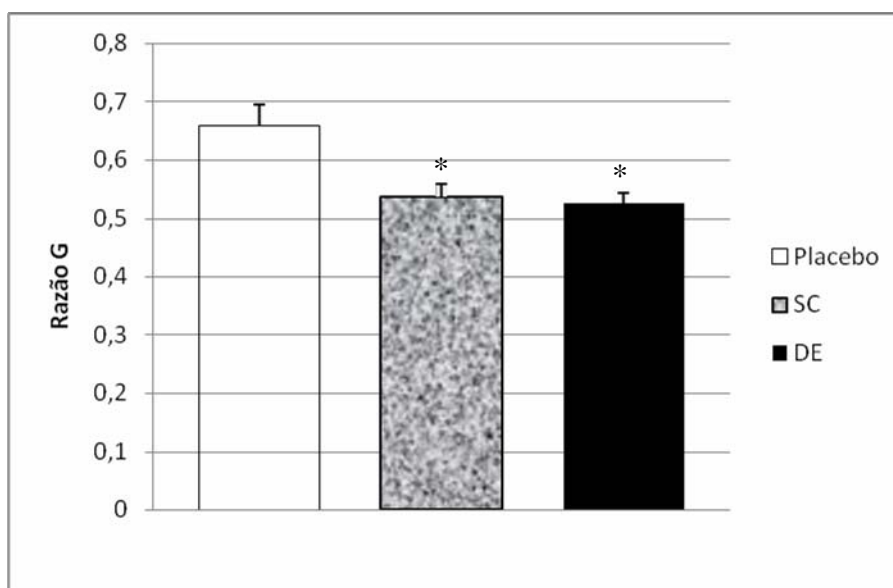
GRÁFICO 2 – Área média da secção transversa das fibras axonais (μm^2) \pm desvio-padrão dos ratos dos seguintes grupos experimentais: SC: grupo submetido a sutura convencional; DE: grupo no qual o deslizamento epineural foi realizado; grupo controle: ratos submetidos a cirurgia sem procedimento microcirúrgico no nervo. * $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (ANOVA)



4.3. RAZÃO ENTRE O DIÂMETRO AXONAL E O DIÂMETRO DA FIBRA

A medida média da razão G (diâmetro da fibra axonal/diâmetro da fibra nervosa) para o grupo SC foi de $0,53 \pm 0,0235 \mu\text{m}^2$. Para o grupo DE, a média correspondeu a $0,52 \pm 0,017 \mu\text{m}^2$. Para o grupo controle, o quociente foi de $0,65 \pm 0,03 \mu\text{m}^2$ em média. Comparando-se o grupo Placebo com o grupo SC e DE, a análise estatística mostrou um decréscimo na razão G ($p < 0,001$, ANOVA). Entre os grupos SC e DE não houve diferença ($p > 0,05$, ANOVA), conforme gráfico 3.

GRÁFICO 3 – A média dos valores da razão entre o diâmetro axonal e o diâmetro da fibra nervosa (Razão G). * $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (ANOVA)



5. DISCUSSÃO

Os defeitos segmentares de nervo são habitualmente tratados por meio de enxertia autóloga. Porém, as desvantagens desse método residem, sobretudo, na morbidade causada na área doadora e nos resultados clínicos aferidos (10). Com base nisso as pesquisas visam encontrar um substituto viável, que promova a regeneração nervosa com o mínimo de características negativas. Numerosos estudos têm sido aplicados, com foco nos mais diversos condutos, desde os biológicos até os artificiais. Contudo, ainda não há uma solução definitiva para o preenchimento desses defeitos.

O presente estudo tomou como base a descrição original de Atabay et al.⁷, citado por Ayhan et al. (14). Aqueles autores utilizaram-se dos pressupostos de identidade de diâmetro do nervo, pouca reação tecidual e não-agressão a outros sítios, para desenvolver uma técnica na qual era realizada uma secção transversa apenas no epineuro do coto proximal, a uma distância suficiente para cobrir o defeito criado (aproximadamente 7 mm). Em seguida, deslizavam esse tubo do epineuro em direção distal, sem comprometer o tronco nervoso ou interferir com sua condução, e anastomosavam essa estrutura com o coto distal. Os primeiros resultados sugeriram que esse método poderia ser uma alternativa aos enxertos de nervo, pois houve evidência de regeneração axonal. Posteriormente, Ayhan et al. (14) e Yavuzer et al. (83) descreveram uma técnica semelhante. Após a retirada segmentar do nervo, o epineuro foi incisado circunferencialmente, imediatamente distal ao nó isquiático, usando tesouras microcirúrgicas, e essa bainha epineural foi então invertida distalmente, formando um tubo, cuja borda livre foi suturada ao epineuro do coto distal. A análise histológica e funcional dos músculos gastrocnêmios não revelou diferença significativa entre o grupo submetido a enxertia autóloga e o grupo no qual a técnica estava sendo empregada. No estudo macroscópico do nervo submetido à inversão do epineuro o tubo de bainha epineural formava uma ponte bem estruturada no local do defeito, e havia mínima adesão no local do qual foi retirado o epineuro e também no tecido ao redor do

⁷ (27. Atabay K, Hong C, Heil BV. The use of sliding epineural sheath tube for repair of peripheral nerve defects. Surg Forum. 1995;45:719-22.

novo tubo epineural. A histomorfometria quantitativa, realizada por Ayhan et al. (14) e Yavuzer et al. (83) revelou que os grupos de enxerto autólogo e o de inversão epineural apresentavam contagem dos axônios mielinizados sem diferença estatisticamente significativa.

Esses resultados encorajaram a continuidade da pesquisa, pois encontrar uma técnica cirúrgica que utilize um tecido nativo, próprio da região, apresenta várias vantagens. Inicia-se pela dispensa de coletar enxerto em outra área, o que diminui sensivelmente a morbidade do procedimento. Também, a coaptação da extremidade do tubo epineural com o coto distal tende a ser satisfatória, pois os diâmetros são idênticos. Outro ponto positivo é que nesse tecido nativo estão presentes potenciais neurotróficos, provendo um melhor ambiente para a regeneração axonal, isso auxiliado pela situação de haver somente um local de coaptação no qual é utilizada sutura, trazendo benefícios com relação aos poucos pontos cirúrgicos presentes - em vez de dois locais para se anastomosar, há apenas um.

Neste trabalho, sete ratos foram submetidos ao procedimento de deslizamento do epineuro do coto distal em direção ao coto proximal. Esses mamíferos foram escolhidos por apresentarem tecido nervoso periférico similar ao humano, mesmo em termos de microscopia eletrônica (84).

A justificativa para a realização do deslizamento do coto distal em direção proximal, em vez de fazê-lo do modo contrário (proximal para distal), baseou-se nos relatos de possível comprometimento do sistema microvascular, pois uma vez que haja uma secção do epineuro, proximalmente, supõe-se que sua vascularização seja igualmente lesada, embora ainda não haja comprovação científica de que isso ocorra (14). Outro ponto favorável ao se utilizar essa técnica reside em evitar lesão a fascículos sadios presentes no coto proximal, quando da secção do epineuro. Quando é feita a secção no coto distal, um eventual dano neural naquele segmento não trará maiores complicações, haja vista tratar-se de uma porção já lesada.

Quanto à técnica de dissecação, preparo e sutura, puderam ser observadas algumas questões que merecem apontamento. A familiaridade com a anatomia da região a ser operada no rato é fundamental para a consecução da cirurgia. Desconhecer os planos musculares, o local de emergência do nervo isquiático, sua bifurcação e a consistência dos tecidos impede a aplicação de uma técnica ou pode

gerar complicações. Problemas enfrentados em cirurgias experimentais em ratos que envolvam lesão nervosa, como automutilação (85), não foram observados.

Condutores tubulares, tanto os artificiais quanto os naturais, levantam a questão sobre a perviedade do segmento implantado, isto é, se o tubo interposto para preencher o defeito permanece aberto no período pós-operatório. Excetuando-se alguns estudos levantados (25, 39, 86, 87), a maior parte dos trabalhos que envolvem o estudo histológico da regeneração neural não efetua o corte longitudinal do nervo, no local da lesão. Isso porque apenas traria um dado a mais, sem qualquer correlação com a regeneração. A prova histológica de que um conduto permaneceu pérvio não significa que os axônios se regeneraram. Por isso, aferirem-se distalmente os dados relativos à regeneração (como número de fibras e a relação entre a bainha de mielina e o diâmetro axonal) já traz, por si, um elemento indireto de que o tubo está aberto – caso contrário, não ocorreria a regeneração.

A aplicação de uma técnica experimental envolve a aferição dos seus dados. Nos estudos com animais roedores são descritos basicamente quatro testes indicadores de regeneração: Índice de função ciática, testes de condução nervosa, contração muscular e morfometria do nervo. O *Índice de função ciática* foi introduzido em 1982, por Medinaceli et al. (88) e modificado posteriormente por Bain et al. (89). Supostamente, esse índice é o que melhor confere a recuperação do nervo, tendo em vista ser dependente da integração da função muscular e sensorial, porém, há limitações quanto à sua aplicabilidade. Por exemplo, o nervo pode ter se recuperado completamente, mas se ocorreu uma rigidez na pata do animal, em face do período de inutilização do membro, haverá alteração do índice de função ciática, sem, entretanto, haver comprometimento quanto à técnica empregada (90). A velocidade de *condução nervosa* – outro dos parâmetros disponíveis – mede as fibras rápidas, uma medida sabidamente dependente do diâmetro do axônio, o grau de mielinização, e a distância entre os nódulos de Ranvier (90). Mas é plausível a situação em que um nervo recupere poucas fibras que conduzam muito bem um estímulo nervoso. Esse teste então demonstrará um eventual vício, pois a velocidade de condução não demonstrará a quantidade de fibras regeneradas, pois podem existir, quantitativamente, poucos neurônios, conduzindo muito rapidamente, o que, para efeitos de aferição de regeneração nervosa, não é fidedigno. O mesmo ocorre com a medida do pico de potencial de

ação do músculo (*contração muscular*), que é derivado de uma corrente elétrica total gerada por grandes axônios mielinizados, representando, portanto, somente os axônios mais rápidos e mielinizados, não-representativos da totalidade de fibras nervosas. Por último, a *contagem axonal* e a *medida de seu diâmetro* sofrem influência do grau de maturação do nervo, mas têm sua validade quando o que se está a estudar seja a regeneração – objeto deste trabalho. Ou seja, não há um único teste possível que seja suficiente para aferir de modo completo a recuperação da função de um nervo. Cada teste deve ser aplicado àquilo que se deseja pesquisar. Por exemplo, se a intenção é verificar a reinervação de um grupo muscular alvo, provavelmente o índice de função ciática seja o teste mais apropriado. No caso de contagem das fibras mielínicas, sabe-se que tomar essa medida como único método de aferição pode não trazer dados confiáveis, uma vez que pode haver axônios em regeneração que emitam ramos, aumentando o número de axônios no sítio reparado (91). No presente trabalho, escolheu-se a contagem axonal com base nos estudos publicados nos quais foram empregadas técnicas semelhantes (14) (83).

A época da eutanásia e retirada das amostras para análise também é objeto de discussão. Estudos prévios indicam que o nível funcional no rato alcança um platô após 6 a 8 semanas do evento cirúrgico, e que não há mudanças significativas no período subsequente (92) (93). Além disso, os axônios tendem a ser maior em diâmetro conforme progride a regeneração, conforme apropriadamente demonstrado em grupos avaliados com 6 e 12 semanas pós-intervenção (25). Autores como Yavuzer et al. (83), Ayhan et al. (14), Siemionow et al. (37) e De Medinacelli (94) optam por aguardar três meses após a cirurgia para a retirada dos segmentos a estudar – mesmo período que o presente estudo.

As técnicas de preparo prévio para visualização no microscópio que permitam a identificação dos axônios restringem-se àquelas preparadas como se para microscopia eletrônica fossem destinadas. Antes do início efetivo do experimento, segmentos de amostras de nervo isquiático foram armazenadas e processadas para coloração em hematoxilina-eosina, conforme Viterbo et al. (48), Lago Jr et al. (95) e Chatdokmaiprai et al. (15). Porém, a visualização de núcleos de células de Schwann apresentava-se com características semelhantes a fibroblastos, o que levava a uma dificuldade na contagem desses núcleos, além do que o número

absoluto de núcleo de células de Schwann não é um indicador fidedigno para o estudo da regeneração neural – conforme as bases anatômicas, o núcleo em questão não encontra um lugar fixo (por exemplo, num ponto eqüidistante das extremidades do nervo), e isso altera a contagem das células. Por isso, optou-se por considerar somente as amostras enviadas para o emblocamento em resina e cortes semifinos, corados com azul de toluidina, e observados sob microscopia óptica.

O passo seguinte consistiu na análise morfométrica dos nervos. Capítulo à parte no estudo da regeneração, diversas técnicas e parâmetros têm sido preconizados, pois é necessário selecionar alguns exemplares de segmentos de nervo a fim de fazer os cálculos morfométricos (96). O tipo de amostragem utilizada não exhibe consenso na literatura. Basicamente, há três modos de estudar amostras de um determinado tecido. Um deles é o método baseado no desenho (*design-based*), o qual preconiza que deve haver uma randomização, ou seja, todas as partículas do material em estudo (v.g. fibras mielínicas) têm que ter exatamente a mesma chance de serem incluídas no cálculo da amostra (regra da igual oportunidade). Outro o método é aquele baseado no modelo (*model-based*), segundo o qual um “modelo” é criado, com base em conhecimentos prévios, a fim de equilibrar e corrigir o peso atribuído a cada uma das estruturas envolvidas, construindo, ao final, uma estimativa (97). Uma terceira opção seria a “esteriologia” descrita por D. C. Sterio⁸, em 1984, citado por Geuna (98). Essa forma de análise consiste em somente incluir na contagem aquelas estruturas cujos “topos” estejam presentes em um determinado campo. Enfim, cada uma dessas diferentes estratégias para quantificação tem seus prós e contras, e não é possível ser dito que uma é melhor que a outra. Conforme mencionou o renomado estatístico Smith, *“todas as inferências são o produto da imaginação do homem e não pode existir um método absolutamente correto de razão indutiva... Minha conclusão geral é que não há paradigma único para inferência estatística e que diferentes classes de problemas requerem diferentes soluções. Em vez de olhar para a unidade nós deveríamos nos concentrar em identificar as diferenças e curtir a diversidade de*

⁸ Esse foi o pseudônimo escolhido pelo autor na época, a fim de que não fosse perpetuamente associado seu nome ao método então criado.

nosso assunto” (Smith ⁹, apud Geuna (97)). Por causa dessas possibilidades, a escolha das amostras é variável nos estudos sobre morfometria de nervos. Há trabalhos que utilizam *o melhor campo histológico* (99), *cinco campos ópticos aleatórios* (14) (100), *seis campos ópticos* (37) (67) (101) (52), *uma determinada porcentagem* (10%), *a área total do nervo* (90) (102) ou *fibras mielínicas em número determinado selecionadas randomicamente* (50). No presente estudo, utilizamos o método descrito por Geuna et al. (81), visando a aumentar a chance de homogeneização das amostras.

Após a determinação do método de amostragem torna-se necessário definir os parâmetros morfométricos que serão estudados. Em estudos de regeneração nervosa, as principais variáveis envolvidas nos estudos de maior relevância são o número de fibras nervosas por milímetro quadrado ou micrômetro quadrado, o diâmetro da fibra (103) e a espessura da bainha de mielina (104) (101) (105) (106).

A bainha de mielina pode ser medida em números absolutos, calculado em micrômetros, ou por meio da razão G [Rushton¹⁰, 1951, Smith e Knowles¹¹, 1970, apud Fazan et al. (107)], quociente obtido da divisão do diâmetro do axônio pelo diâmetro da fibra (ver figura 13). O diâmetro da fibra mielínica em nervo misto, como o isquiático, varia entre 1 e 30 μm (96), sendo muito raro fibras de diâmetro inferior a 1 μm no sistema nervoso periférico (108). Em nervos em cicatrização, apesar de o diâmetro total da fibra diminuir, ocorre um aumento da espessura da bainha de mielina nas fases iniciais (109). Essa relação vai se invertendo conforme a cicatrização progride – o diâmetro aumenta, e a espessura da bainha de mielina fica mais fina. Valores baixos, ao redor de 0,4, indicam que está havendo uma degeneração axonal, enquanto valores altos (em torno de 0,7) traduzem ou degeneração mielínica ou regeneração (80). Níveis como os encontrados no

⁹ Smith TMF. Sample surveys 1975–1990: an age of reconciliation? Int Stat Rev, 1994: 62:5–34. “*All inferences are the product of man’s imagination and there can be no absolutely correct method of inductive reasoning ... My overall conclusion is that there is no single paradigm for statistical inference and that different classes of problems require different solutions. Instead of looking for unity we should concentrate on identifying the differences and enjoy the diversity of our subject*”.

¹⁰ Rushton WAH. A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. J Physiol, 1951: 115:101–122.

¹¹ Smith RS, Koles ZJ. Myelinated nerve fibers: computed effect of myelin thickness on conduction velocity. Am J Physiol, 1970: 219:1256–1258.

presente trabalho (0,53 para o grupo SC; 0,52 para o DE) podem indicar que está havendo uma regeneração, pois a bainha de mielina provavelmente está sendo novamente formada, apresentando, por isso, espessura maior em relação ao axônio. No trabalho de Tetik et al. (67) – técnica em manga de camisa – essa relação ficou entre 0,7 e 0,8 nos grupos em teste, mas os autores não justificam esses valores. Os estudos com técnica semelhante à empregada (14, 83) não levaram em conta a razão G, mas essa é uma medida útil nesta espécie de estudo (25, 110), pois ao associá-la à medida da área da fibra do axônio, é possível pressupor se está ocorrendo mielinização (103). Os valores da razão G não obedecem a um padrão, motivo pelo qual se faz necessária a comparação com um grupo controle. Por exemplo, o trabalho de Fansa et al. (25) evidenciou um aumento na razão G nos grupos em que as técnicas em estudo foram aplicadas; no relato de De Sá (80), contudo, os valores nos grupos em estudo mostraram-se inferiores aos do placebo. Isso pode ser explicado porque há diferenças nas técnicas empregadas e entre os animais experimentais nos diversos centros de pesquisa, de modo que não é possível ser dito que sempre haverá um aumento, ou diminuição, da razão G em uma determinada época de sacrifício dos animais – cada estudo tem a sua particularidade e, por essa razão, os trabalhos contam com um grupo controle ou placebo. Se fosse linear e taxativa uma inferência dessa natureza (por exemplo, *a razão G aos 3 meses de pós-operatório numa sutura epineural convencional é de 0,65*), a comparação com um grupo controle e/ou placebo seria desnecessária.

A área da fibra axonal tende a ser menor após uma cirurgia de reparação (101) (80). No estudo corrente, os valores médios das áreas da fibra axonal nos grupos SC e DE não apresentaram diferença estatística significativa, contrariamente à comparação com o grupo placebo, que apresentou uma área maior. Esses achados reforçam a suposição de que uma regeneração estava em curso pois, se houve diminuição do diâmetro axonal e diminuição da razão G nos grupos SC e DE, provavelmente isso se deveu ao aumento da espessura da bainha de mielina.

O número absoluto de fibras nervosas é mais um dos parâmetros a se considerar em termos de regeneração neural (103). O que é sabido é que nos primeiros meses de pós-operatório a contagem das fibras no segmento distal é geralmente maior do que nos grupos-controle (37, 90, 106, 111-113), com uma

redução progressiva do número de fibras em regeneração conforme os axônios alcançam seu alvo e amadurecem – devido aos fatores de crescimento induzidos pelo órgão-alvo (35). Em um estudo experimental realizado por meio de uma lesão sem a secção do nervo (*v. g.* congelação *in situ*), a contagem de fibras mielínicas em regeneração aumentou em 220% um mês após a lesão, estabilizando-se em 190% após 18 meses. Porém, o diâmetro da fibra diminuiu para 36% da medida obtida no grupo controle, progredindo para 70% ao fim do 18º mês (111). Ressalte-se que não houve solução de continuidade do nervo, o que pode explicar o aumento significativo no número de fibras nervosas. Já numa secção traumática do nervo, como em um corte linear, uma proliferação exacerbada de axônios talvez possa traduzir uma má recuperação, pois significa que não está havendo um alcance satisfatório de fibras nos órgãos-alvo, que continua a liberar fatores de crescimento (90).

Esses indicadores avaliados (diâmetro do axônio, diâmetro da bainha de mielina e concentração de fibras nervosas) não são indicativos absolutos de recuperação funcional do membro operado. A mielinização, por exemplo, ocorre antes de o axônio encontrar seu alvo (90) – logo, por melhores que sejam os dados da morfometria do nervo, não há garantia de que o órgão-alvo seja atingido.

Porém, se o ideal em uma anastomose entre cotos de nervo é uma sutura livre de tensão, então a comparação histológica de uma técnica com aquele padrão é provavelmente um método válido. Logo, o que se pretende demonstrar é exatamente o grau de regeneração nervosa quando comparado com o método considerado ideal de sutura, qual seja, a sutura término-terminal (aqui denominado SC). E esses dados, no trabalho presente, não apresentaram diferença estatisticamente significativa, do que se infere que possa ter havido uma regeneração neuronal do grupo submetido a deslizamento epineural similar ao da sutura convencional.

Os estudos experimentais que aferem a regeneração neural diferem quanto aos modos de aferição dos dados encontrados. Estudos com veia usam imunohistoquímica em sua metodologia (39); trabalhos que avaliam a cola de fibrina visam estudar a reação inflamatória (86); avaliação de conduto a base de silicone considera as reações enzimáticas com peroxidase (114), de modo que a falta de uniformidade dificulta o cotejamento dos resultados entre os diferentes artigos.

Convém, entretanto, tecer algumas considerações sobre os dados encontrados e aferidos neste trabalho. Inicialmente, reitera-se que o estudo foi conduzido em nervo periférico (isquiático) de animais (ratos), modelo experimental considerado como o primeiro passo nos estudos de eficácia de tratamento relacionado à regeneração neural (115) – apesar de começarem a surgir evidências de que é preferível as patas dianteiras de ratos às traseiras para o estudo de nervos (116). Embora, como mencionado, o tecido nervoso periférico possua propriedades indistinguíveis do nervo humano à microscopia eletrônica (84), é lícito supor que os termos em que ocorre a cicatrização nervosa não devem ser os mesmos para todos os mamíferos, pois numerosos fatores estão envolvidos, consoante explicação anterior¹², principalmente quando se leva em conta que nervos de ratos possuem uma capacidade de regeneração excepcional (115). Igualmente, operar um nervo de rato cujo traumatismo (secção) foi produzido de modo seletivo, com a dissecação cuidadosa dos planos e uso de material esterilizado, não reproduz com exatidão as condições freqüentemente encontradas na prática médica, como ocorre nos pacientes vítimas de acidente há 10 dias, por exemplo. Outro fator que traduz a diferenciação entre experimentos com ratos e humanos é a consistência do nervo. O epineuro do animal em estudo possui consistência diversa daquela verificada no homem – mais gelatinoso, mais friável, mais delicado, ainda que seja um nervo de grosso calibre para o animal. Deve ser levantado, também, que o defeito segmentar produzido de 5 mm foi definido empiricamente, e a falta de mais um grupo controle – com o sepultamento dos cotos em tecido muscular para evitar a regeneração espontânea (92) – não permitiu aferir o que aconteceria se o deslizamento epineural fosse feito, mas não fosse realizada a anastomose entre o coto distal (epineuro deslizado) e o proximal. Um defeito de meio centímetro no nervo isquiático de rato é impossível de ser correlacionado metricamente a uma lesão no nervo periférico de humano. Por mais que se estabeleçam as proporções, em termos morfológicos, entre as duas espécies de mamíferos, estudos de nervo periférico em humano não são conduzidos em nervos isquiáticos – os trabalhos que detalham os nervos mistos geralmente focam o plexo braquial ou seus ramos. Isso torna difícil reproduzir e extrapolar os achados de estudos experimentais desta natureza para

¹² V. tópico 2.2., p. 11 (*Princípios Gerais da Regeneração e Reparo Neural*)

tecidos nervosos do homem, de modo que, para verificar sua exeqüibilidade na prática, seria necessário aplicar em seres humanos a técnica proposta.

Outra menção necessária – nunca é demasiado evidenciar – diz respeito à ausência de resultados funcionais, eletrofisiológicos e os atinentes à reinervação muscular. No presente estudo, os dados demonstrados revelam uma evidência de que uma regeneração neural possa ocorrer de modo similar em nervos submetidos a uma secção transversa com anastomose término-terminal e aqueles em que um deslizamento do epineuro distal é realizado, a fim de cobrir um defeito segmentar de 5 mm.

6. CONCLUSÃO

O deslizamento epineural do coto distal em direção ao coto proximal revelou resultados morfométricos similares aos obtidos nos grupos em que apenas a sutura convencional foi realizada. Os dois grupos apresentaram em relação ao grupo Placebo:

1. Maior número de fibras mielínicas;
2. Diminuição da área das fibras axonais;
3. Menor razão entre o diâmetro axonal e o diâmetro da fibra (razão G).

Esses dados sugerem que a técnica estudada é eficaz para a cobertura de defeitos segmentares de nervo de rato.

REFERÊNCIAS

1. IJkema-Paassen J, Jansen K, Gramsbergen A, Meek MF. Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials*. 2004 Apr;25(9):1583-92.
2. Evans GR. Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat Rec*. 2001 Aug 1;263(4):396-404.
3. Naff NJ, Ecklund JM. History of peripheral nerve surgery techniques. *Neurosurg Clin N Am*. 2001 Jan;12(1):197-209, x.
4. Millesi H, Meissl G, Berger A. Further experience with interfascicular grafting of the median, ulnar and radial nerves. *J Bone Joint Surg Am*. 1976;58:209-18.
5. Sulaiman WAR, Kline DG. Nerve surgery: a review and insights about its future. *Clinical Neurosurgery*. 2006;53(38-47).
6. Battiston B, Geuna S, Ferrero M, Tos P. Nerve repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair. *Microsurgery*. 2005;25(4):258-67.
7. Meek MF, Coert JH. Clinical use of nerve conduits in peripheral-nerve repair: review of the literature. *J Reconstr Microsurg*. 2002 Feb;18(2):97-109.
8. Stoll G, Jander S, Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst*. 2002 Mar;7(1):13-27.
9. Merle M, Dellon AL, Campbell JN, Chang PS. Complications from silicon-polymer intubulation of nerves. *Microsurgery*. 1989;10(2):130-3.
10. Meek MF, Coert JH, Robinson PH. Poor results after nerve grafting in the upper extremity: Quo vadis? *Microsurgery*. 2005;25(5):396-402.
11. IJpma FF, Nicolai JP, Meek MF. Sural nerve donor-site morbidity: thirty-four years of follow-up. *Ann Plast Surg*. 2006 Oct;57(4):391-5.
12. Birch R, Raji AR. Repair of median and ulnar nerves. Primary suture is best. *J Bone Joint Surg Br*. 1991 Jan;73(1):154-7.
13. Birch R. Nerve repair. In: Green DP, Hothkiss RN, Pederson WC, Wolfe SW, editors. *Green's operative hand surgery*. Philadelphia: Elsevier; 2005. p. 1075-111.
14. Ayhan S, Yavuzer R, Latifoglu O, Atabay K. Use of the turnover epineurial sheath tube for repair of peripheral nerve gaps. *J Reconstr Microsurg*. 2000 Jul;16(5):371-8.
15. Chatdokkaiprai C, Suwansingh W, Worapongpaiboon S. The turnover distal epineurial sheath tube for repair of peripheral nerve gaps. *J Med Assoc Thai*. 2006 May;89(5):663-9.
16. Doi K, Tamaru K, Sakai K, Kuwata N, Kurafuji Y, Kawai S. A comparison of vascularized and conventional sural nerve grafts. *J Hand Surg [Am]*. 1992 Jul;17(4):670-6.
17. Kalomiri DE, Soucacos PN, Beris AE. Nerve grafting in peripheral nerve microsurgery of the upper extremity. *Microsurgery*. 1994;15(7):506-11.
18. Kallio PK, Vastamaki M. An analysis of the results of late reconstruction of 132 median nerves. *J Hand Surg [Br]*. 1993 Feb;18(1):97-105.

19. Tang JB, Gu YQ, Song YS. Repair of digital nerve defect with autogenous vein graft during flexor tendon surgery in zone 2. *J Hand Surg [Br]*. 1993 Aug;18(4):449-53.
20. Tang JB. Vein conduits with interposition of nerve tissue for peripheral nerve defects. *J Reconstr Microsurg*. 1995 Jan;11(1):21-6.
21. Calder JS, Green CJ. Nerve-muscle sandwich grafts: the importance of Schwann cells in peripheral nerve regeneration through muscle basal lamina conduits. *J Hand Surg [Br]*. 1995 Aug;20(4):423-8.
22. Battiston B, Tos P, Cushway TR, Geuna S. Nerve repair by means of vein filled with muscle grafts I. Clinical results. *Microsurgery*. 2000;20(1):32-6.
23. Mattar Jr R, Starck R, Guarnieri MV, Azze RJ, Mitteldorf CS, Ferreira MC. Utilização de enxerto de membrana basal de fibra muscular estriada para reparação de lesões de nervos periféricos: estudo experimental. *Rev Bras Ortop*. 1990;25(8):287-2.
24. Weber RA, Breidenbach WC, Brown RE, Jabaley ME, Mass DP. A randomized prospective study of polyglycolic acid conduits for digital nerve reconstruction in humans. *Plast Reconstr Surg*. 2000 Oct;106(5):1036-45; discussion 46-8.
25. Fansa H, Keilhoff G, Wolf G, Schneider W, Gold BG. Tissue Engineering of Peripheral Nerves: A Comparison of Venous and Acellular Muscle Grafts with Cultured Schwann Cells. *Plast Reconstr Surg*. 2001 Feb;107(2):495-6.
26. Strauch B, Ferder M, Lovelle-Allen S, Moore K, Kim DJ, Llena J. Determining the maximum length of a vein conduit used as an interposition graft for nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg*. 1997;8:605.
27. Atabay K, Hong C, Heil BV. The use of sliding epineural sheath tube for repair of peripheral nerve defects. *Surg Forum*. 1995;45:719-22.
28. Wright II PE, Jobe MT. Lesões dos nervos periféricos. In: Greenshaw AH, editor. *Cirurgia Ortopédica de Campbell*. São Paulo: Manole; 1997. p. 2378-406.
29. Keynes RD, Aidley DJ. *Nerve Nerve and Muscle*. New York: Cambridge University Press; 2001. p. 2-10.
30. Ide C. Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res*. 1996 Jun;25(2):101-21.
31. Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol*. 1997 Feb-Apr;14(1-2):67-116.
32. Martins RS, Siqueira MG, Silva CF, Plese JPP. Mecanismos básicos de regeneração de nervos. *Arq Bras Neurocir*. 2005;24(1):20-5.
33. Bandoğlu E. Guided peripheral nerve regeneration. *Biomaterials and tissue engineering research center*; 2006.
34. Johnson EO, Zoubos AB, Soucacos PN. Regeneration and repair of peripheral nerves. *Injury*. 2005 Nov;36 Suppl 4:S24-9.
35. Belkas JS, Shoichet MS, Midha R. Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. *Neurol Res*. 2004 Mar;26(2):151-60.
36. Siemionow M, Sari A. A contemporary overview of peripheral nerve research from the Cleveland Clinic microsurgery laboratory. *Neurol Res*. 2004 Mar;26(2):218-25.
37. Siemionow M, Zielinski M, Meirer R. The single-fascicle method of nerve grafting. *Ann Plast Surg*. 2004 Jan;52(1):72-9.

38. Saito I, Oka Y, Odaka M. Promoting nerve regeneration through long gaps using a small nerve tissue graft. *Surg Neurol*. 2003 Mar;59(3):148-54; discussion 54-5.
39. Tseng CY, Hu G, Ambron RT, Chiu DT. Histologic analysis of Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration in the autogenous venous nerve conduit (AVNC). *J Reconstr Microsurg*. 2003 Jul;19(5):331-40.
40. Midha R. Peripheral nerve repair and grafting techniques: a review. Toronto; 2001.
41. Millesi H. Interfascicular nerve grafting. *Orthop Clin North Am*. 1981 Apr;12(2):287-301.
42. Brushart TM, Tarlov EC, Mesulam MM. Specificity of muscle reinnervation after epineurial and individual fascicular suture of the rat sciatic nerve. *J Hand Surg [Am]*. 1983 May;8(3):248-53.
43. Hudson AR, Hunter D, Kline DG, Bratton BR. Histological studies of experimental interfascicular graft repairs. *J Neurosurg*. 1979 Sep;51(3):333-40.
44. Levinthal R, Brown WJ, Rand RW. Comparison of fascicular, interfascicular and epineurial suture techniques in the repair of simple nerve lacerations. *J Neurosurg*. 1977 Nov;47(5):744-50.
45. Ogata K, Naito M. Blood flow of peripheral nerve effects of dissection, stretching and compression. *J Hand Surg [Br]*. 1986 Feb;11(1):10-4.
46. Stromberg BV, Vlastou C, Earle AS. Effect of nerve graft polarity on nerve regeneration and function. *J Hand Surg [Am]*. 1979 Sep;4(5):444-5.
47. Moneim MS. Interfascicular nerve grafting. *Clin Orthop Relat Res*. 1982 Mar;163:65-74.
48. Viterbo F, Trindade JC, Hoshino K, Mazzoni Neto A. Latero-terminal neurorrhaphy without removal of the epineurial sheath. Experimental study in rats. *Rev Paul Med*. 1992 Nov-Dec;110(6):267-75.
49. McCallister WV, Tang P, Smith J, Trumble TE. Axonal regeneration stimulated by the combination of nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor in an end-to-side model. *J Hand Surg [Am]*. 2001 May;26(3):478-88.
50. Zhang Z, Soucacos PN, Beris AE, Bo J, Ioachim E, Johnson EO. Long-term evaluation of rat peripheral nerve repair with end-to-side neurorrhaphy. *J Reconstr Microsurg*. 2000 May;16(4):303-11.
51. Matsuda K, Kakibuchi M, Fukuda K, Kubo T, Madura T, Kawai K, et al. End-to-side nerve grafts: experimental study in rats. *J Reconstr Microsurg*. 2005 Nov;21(8):581-91.
52. Tarasidis G, Watanabe O, Mackinnon SE, Strasberg SR, Haughey BH, Hunter DA. End-to-side neurorrhaphy: a long-term study of neural regeneration in a rat model. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1998 Oct;119(4):337-41.
53. Risitano G, Cavallaro G, Lentini M. Autogenous vein and nerve grafts: a comparative study of nerve regeneration in the rat. *J Hand Surg [Br]*. 1989 Feb;14(1):102-4.
54. Chiu DT, Strauch B. A prospective clinical evaluation of autogenous vein grafts used as a nerve conduit for distal sensory nerve defects of 3 cm or less. *Plast Reconstr Surg*. 1990 Nov;86(5):928-34.
55. Fernandes M, Valente SG, Amado D, Fernandes MJS, Naffah-Mazzacoratti MG, Santos JBG, et al. Estudo comparativo entre enxerto autógeno e enxerto muscular coberto com tubo de veia autógeno em nervos tibiais de ratos wistar,

utilizando o fluoro-gold® como marcador neuronal *Acta Ortop Bras.* 2007;15(2):97-100.

56. Pogrel MA, McDonald AR, Kaban LB. Gore-Tex tubing as a conduit for repair of lingual and inferior alveolar nerve continuity defects: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998 Mar;56(3):319-21; discussion 21-2.

57. Cunha AS, Lemos SPS, Silva CF, Barros Filho TEP, Costa MP, Ferreira MC. Utilização da veia glicerolada na regeneração neural: Estudo experimental em ratos. *Acta Ortop Bras.* 2007;15(4):210-3.

58. Barcelos AS, Rodrigues AC, Silva MD, Padovani CR. Inside-out vein graft and inside-out artery graft in rat sciatic nerve repair. *Microsurgery.* 2003;23(1):66-71.

59. Wang KK, Costas PD, Bryan DJ, Eby PL, Seckel BR. Inside-out vein graft repair compared with nerve grafting for nerve regeneration in rats. *Microsurgery.* 1995;16(2):65-70.

60. Kelleher MO, Al-Abri RK, Eleuterio ML, Myles LM, Lenihan DV, Glasby MA. The use of conventional and invaginated autologous vein grafts for nerve repair by means of entubulation. *Br J Plast Surg.* 2001 Jan;54(1):53-7.

61. Büngner OV. Ueber die Degenerations und Regenerationsvorgänge am Nerven nach Verletzungen. *Beitr Pathol Anat.* 1891;10:321.

62. Meek MF, den Dunnen WF, Schakenraad JM, Robinson PH. Evaluation of several techniques to modify denatured muscle tissue to obtain a scaffold for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials.* 1999 Mar;20(5):401-8.

63. Pereira JH, Bowden RE, Gattuso JM, Norris RW. Comparison of results of repair of digital nerves by denatured muscle grafts and end-to-end sutures. *J Hand Surg [Br].* 1991 Dec;16(5):519-23.

64. Pereira JH, Palande DD, Subramanian A, Narayanakumar TS, Curtis J, Turk JL. Denatured autologous muscle graft in leprosy. *Lancet.* 1991 Nov 16;338(8777):1239-40.

65. Snyder CC, Browne E. Epineural cuff neurorrhaphy. *J Bone Joint Surg Am.* 1974;56:1092.

66. Siemionow M, Tetik C, Ozer K, Ayhan S, Siemionow K, Browne E. Epineural sleeve neurorrhaphy: surgical technique and functional results--a preliminary report. *Ann Plast Surg.* 2002 Mar;48(3):281-5.

67. Tetik C, Ozer K, Ayhan S, Siemionow K, Browne E, Siemionow M. Conventional versus epineural sleeve neurorrhaphy technique: functional and histomorphometric analysis. *Ann Plast Surg.* 2002 Oct;49(4):397-403.

68. Braga-Silva J. The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm. *J Hand Surg [Br].* 1999 Dec;24(6):703-6.

69. Dahlin L, Lundborg G. The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm. *J Hand Surg [Br].* 2001 Aug;26(4):393-4.

70. Dahlin LB, Anagnostaki L, Lundborg G. Tissue response to silicone tubes used to repair human median and ulnar nerves. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2001 Mar;35(1):29-34.

71. Stanec S, Stanec Z. Ulnar nerve reconstruction with an expanded polytetrafluoroethylene conduit. *Br J Plast Surg.* 1998 Dec;51(8):637-9.

72. Stanec S, Stanec Z. Reconstruction of upper-extremity peripheral-nerve injuries with ePTFE conduits. *J Reconstr Microsurg.* 1998 May;14(4):227-32.

73. Schlosshauer B, Dressmann L, Schaller HE. Synthetic nerve guide implants in humans: a comprehensive survey. *Neurosurg* 2006;59:740-8.

74. Mackinnon SE, Dellon AL. Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid tube. *Plast Reconstr Surg*. 1990 Mar;85(3):419-24.
75. Pitta MC, Wolford LM, Mehra P, Hopkin J. Use of Gore-Tex tubing as a conduit for inferior alveolar and lingual nerve repair: experience with 6 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2001 May;59(5):493-6; discussion 7.
76. Zhang F, Blain B, Beck J, Zhang J, Chen Z, Chen ZW, et al. Autogenous venous graft with one-stage prepared Schwann cells as a conduit for repair of long segmental nerve defects. *J Reconstr Microsurg*. 2002 May;18(4):295-300.
77. Rodriguez FJ, Verdu E, Ceballos D, Navarro X. Nerve guides seeded with autologous schwann cells improve nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2000 Feb;161(2):571-84.
78. Dezawa M, Takahashi I, Esaki M, Takano M, Sawada H. Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur J Neurosci*. 2001 Dec;14(11):1771-6.
79. Martins RS, Siqueira MG. Utilização das células-tronco no tratamento das lesões traumáticas de nervos: artigo de revisão *Arq Bras Neurocir*. 2005;24(2):67-72.
80. De Sá JM, Mazzer N, Barbieri CH, Barreira AA. The end-to-side peripheral nerve repair. Functional and morphometric study using the peroneal nerve of rats. *J Neurosci Methods*. 2004 Jun 15;136(1):45-53.
81. Geuna S, Gigo-Benato D, Rodrigues Ade C. On sampling and sampling errors in histomorphometry of peripheral nerve fibers. *Microsurgery*. 2004;24(1):72-6.
82. Urso-Baiarda F, Grobbelaar AO. Practical nerve morphometry. *J Neurosci Methods*. 2006 Sep 30;156(1-2):333-41.
83. Yavuzer R, Ayhan S, Latifoglu O, Atabay K. Turnover epineural sheath tube in primary repair of peripheral nerves. *Ann Plast Surg*. 2002 Apr;48(4):392-400.
84. Mackinnon SE, Hudson AR, Hunter DA. Histologic assessment of nerve regeneration in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1985 Mar;75(3):384-8.
85. Rubinstein RE, Deem KC, Jensen J, MacKinnon SE, Tung TH. Strain differences in autotomy in mice after peripheral nerve transection or repair. *Microsurgery*. 2003;23(4):363-8.
86. Ornelas L, Padilla L, Di Silvio M, Schalch P. Fibrin glue: an alternative technique for nerve coaptation - part II. Nerve regeneration and histomorphometric assessment. *J Reconstr Microsurg*. 2006;22(2):123-8.
87. Schwabegger AH, Hussl H. Fetal spinal-cord allograft as a substitute for peripheral-nerve reconstruction: a preliminary experimental and histologic study. *J Reconstr Microsurg*. 2001;17(1):45-50.
88. de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*. 1982 Sep;77(3):634-43.
89. Bain JR, Mackinnon SE, Hunter DA. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*. 1989 Jan;83(1):129-38.
90. Kanaya F, Firrell JC, Breidenbach WC. Sciatic function index, nerve conduction tests, muscle contraction, and axon morphometry as indicators of regeneration. *Plast Reconstr Surg*. 1996 Dec;98(7):1264-71, discussion 72-4.
91. Yoshii S, Oka M, Ikeda N, Akagi M, Matsusue Y, Nakamura T. Bridging a peripheral nerve defect using collagen filaments. *J Hand Surg [Am]*. 2001 Jan;26(1):52-9.

92. Mott FW, Halliburton WD, Edmunds A. Regeneration of nerves. *Proceedings of the Royal Society of London* 1906;78(525):259-83.
93. de Medinaceli L, Seaber AV. Experimental nerve reconnection: importance of initial repair. *Microsurgery*. 1989;10(1):56-70.
94. de Medinaceli L. Interpreting nerve morphometry data after experimental traumatic lesions. *J Neurosci Methods*. 1995 May;58(1-2):29-37.
95. Lago Jr O, Bortolletto C, Araújo A, Donoso C, Kume P, Repka J. Avaliação funcional e histológica do reparo de nervo ciático utilizando cola de fibrina e sutura em ratos Wistar. *Rev Bras Ortop*. 2005;40(1):69-78.
96. Romero E, Cuisenaire O, Denef JF, Delbeke J, Macq B, Veraart C. Automatic morphometry of nerve histological sections. *J Neurosci Methods*. 2000 Apr 15;97(2):111-22.
97. Geuna S. Appreciating the difference between design-based and model-based sampling strategies in quantitative morphology of the nervous system. *J Comp Neurol*. 2000 Nov 20;427(3):333-9.
98. Geuna S. The revolution of counting "tops": two decades of the disector principle in morphological research. *Microsc Res Tech*. 2005 Apr 1;66(5):270-4.
99. Oliveira EF, Mazzer N, Barbieri CH, Selli M. Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. *J Reconstr Microsurg*. 2001 Jan;17(1):69-75.
100. Dam-Hieu P, Lacroix C, Said G, Devanz P, Liu S, Tadie M. Reduction of postoperative perineural adhesions by Hyaloglidle gel: an experimental study in the rat sciatic nerve. *Neurosurgery*. 2005 Apr;56(2 Suppl):425-33; discussion -33.
101. Stopliglia AJ, Lainetti RD, Pires RS, Da Silva CF. Avaliação Morfométrica de Fibras nervosas do nervo ulnar após reparação cirúrgica com auto-enxerto e prótese tubular em cães. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 1998;35(2):80-3.
102. Sugita N, Ishida O, Ikuta Y, Takata H, Kajihara H, Tomita Y, et al. Interposed autologous nerve segment stimulates nerve regeneration in peripheral nerve allografts in a rat model. *J Reconstr Microsurg*. 2004 Feb;20(2):167-74.
103. Stanmore A, Bradbury S, Weddell GM. A quantitative study of peripheral nerve fibres in the mouse following the administration of drugs. *J Anat*. 1978;127(1):101-15.
104. Berthold CH, Lugnegard H, Rydmark M. Ultrastructural morphometric studies on regeneration of the lateral sural cutaneous nerve in the white rat after transection of the sciatic nerve. *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*. 1984;20:1-126.
105. Sunderland S, Roche AF. Axon-myelin relationships in peripheral nerve fibres. *Acta Anat (Basel)*. 1958;33(1-2):1-37.
106. Tark KC, Roh TS. Morphometric study of regeneration through vascularized nerve graft in a rabbit sciatic nerve model. *J Reconstr Microsurg*. 2001 Feb;17(2):109-14.
107. Fazan VP, Ma X, Chapleau MW, Barreira AA. Qualitative and quantitative morphology of renal nerves in C57BL/6J mice. *Anat Rec*. 2002;268(4):399-404.
108. Ritchie JM. On the relation between fibre diameter and conduction velocity in myelinated nerve fibres. *Proc R Soc Lond*. 1982;217:29-35.
109. Sanders FK. The thickness of the myelin sheaths of normal and regenerating peripheral nerve fibres. *Proceedings of the Royal Society of London*. 1948;135(880):323-57.
110. Santos X, Rodrigo J, Hontanilla B, Bilbao G. Evaluation of peripheral nerve regeneration by nerve growth factor locally administered with a novel system. *J Neurosci Methods*. 1998;85:119-27.

111. Mira JC. Quantitative studies of the regeneration of rat myelinated nerve fibres: variations in the number and size of regenerating fibres after repeated localized freezings. *J Anat.* 1979 Aug;129(Pt 1):77-93.
112. Mackinnon SE, Dellon AL, O'Brien JP, Goldberg N, Hunter DA, Seiler WAt, et al. Selection of optimal axon ratio for nerve regeneration. *Ann Plast Surg.* 1989 Aug;23(2):129-34.
113. Mazzer PYCN, Barbieri CH, Mazzer N, Fazan VP. Qualitative and quantitative evaluation of rats acute injuries caused by ischiatic nerve smashing. . *Acta Ortop Bras.* 2006;14(4):220-4.
114. Zhang J, Oswald TM, Lineaweaver WC, Chen ZW, Zhang G. Enhancement of rat sciatic nerve regeneration by fibronectin and laminin through a silicone chamber. *J Reconstr Microsurg.* 2003;19(7):467-72.
115. Myckatyn TM, Mackinnon SE. A review of research endeavors to optimize peripheral nerve reconstruction. *Neurol Res.* 2004;26(2):124-38.
116. Geuna S, Tos P, Raimundo S, Lee JM, Gambarotta G, Nicolino S, et al. Functional, morphological and biomolecular assessment of posttraumatic neuromuscular recovery in the rat forelimb model. *Acta Neurochir Suppl.* 2007;100:173-7.

ANEXO

APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA – PUC-PR